



HAL
open science

Identification de nouveaux régulateurs du trafic et de l'activité signalisatrice des ligands du récepteur Notch chez la drosophile : analyse du rôle des glycosphingolipides

Sophie Hamel

► **To cite this version:**

Sophie Hamel. Identification de nouveaux régulateurs du trafic et de l'activité signalisatrice des ligands du récepteur Notch chez la drosophile : analyse du rôle des glycosphingolipides. Morphogénèse. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : 2009PA066589 . tel-00814260

HAL Id: tel-00814260

<https://theses.hal.science/tel-00814260>

Submitted on 16 Apr 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

SPECIALITE BIOLOGIE-ECOLE DOCTORALE COMPLEXITE DU VIVANT

Présentée par Sophie Hamel

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Pierre et Marie Curie
Paris 6

Identification de nouveaux régulateurs du trafic et
de l'activité signalisatrice des ligands du récepteur
Notch chez la drosophile

Analyse du rôle des glycosphingolipides

Thèse dirigée par François Schweisguth
Soutenue le vendredi 9 octobre 2009 devant le jury composé de :

Denise Busson président du jury
Arnaud Echard examinateur
Alain Israel examinateur
Catherine Rabouille rapporteur
François Schweisguth directeur de thèse
Pascal Théron rapporteur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement François grâce à qui j'ai tant appris pendant ma thèse. Merci d'avoir encadré mon travail, ces années passées dans ton laboratoire resteront un excellent souvenir. Je tacherai de ne pas oublier tous tes conseils et essayerai d'être aussi claire, créative et efficace que toi !

Merci à Jacques Fantini pour sa contribution en biochimie et en biophysique qui valorise beaucoup l'ensemble des résultats sur le rôle des glycosphingolipides dans la signalisation Notch.

Merci également à Frédérique Logeat, Sara Heuss et Christel Brou pour m'avoir initié aux DRM, pour toutes ces discussions sur les « lipid raft », mais aussi pour leur enthousiasme et leur gentillesse.

Merci à Denise Busson, Catherine Rabouille, Pascal Théron, Alain Israel et Arnaud Echard d'avoir accepté d'être dans mon jury de thèse et de m'avoir permis d'améliorer ce manuscrit.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, passé et présent, pour tous les moments que nous avons vécu ensemble. Et particulièrement à Allison, Zé, Maria, Carolina et Soline, cela a été un grand plaisir de vous rencontrer.

Merci à Marie pour avoir partagé avec moi les joies du monitorat et ainsi que les brunchs le dimanche avant d'aller manipuler. Merci encore à Sybille, Marlène, Noémie, Soline, Carolina, j'espère qu'on ne se perdra pas trop de vue dans les années qui viennent.

Et enfin un grand merci à Manu, qui a mine de rien beaucoup participé à cette thèse !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	12
<i>1. La signalisation par le récepteur Notch et ses différents niveaux de régulation</i>	<i>16</i>
1.1 Les principaux acteurs de la signalisation canonique par le récepteur Notch	16
1.2 Implication de la signalisation Notch dans différentes pathologies humaines	17
1.3 Rôles de la signalisation par le récepteur Notch au cours du développement.....	19
1.3.1 Exemple d'un rôle restrictif de la signalisation Notch : la mise en place des soies mécanosensorielles sur le notum de drosophile.....	21
1.3.2 Exemple d'un rôle inductif de la signalisation Notch: la mise en place de la marge de l'aile chez la drosophile	22
1.4 Les bases moléculaires de l'activation du récepteur Notch par les ligands DSL	23
1.4.1 Structure du récepteur Notch	24
1.4.2 Les ligands DSL induisent un changement de conformation du récepteur qui permet son activation	26
1.5 Les différents niveaux de régulation de l'activation du récepteur Notch	28
1.5.1 Régulation du patron d'expression des ligands de Notch.....	28
1.5.2 Effet <i>cis</i> -inhibiteur des ligands sur l'activité de Notch.....	29
1.5.3 Régulation de l'interaction ligand-récepteur par glycosylation du récepteur.....	29
1.5.4 Régulation de l'activité des ligands par protéolyse.....	30
1.5.5 Importance de l'endocytose dans la régulation de la signalisation Notch.....	30
<i>2 Importance du trafic membranaire dans la signalisation Notch, et rôle de l'ubiquitination et de l'endocytose des ligands dans l'activation du récepteur Notch</i>	<i>32</i>
2.1 L'endocytose en quelques étapes fondamentales.....	32
2.1.1 Identification du cargo par la machinerie d'endocytose.....	33
2.1.2 -Invagination de la membrane, formation et détachement de la vésicule.....	34
2.1.3 -Reconnaissance et fusion au compartiment cible	35
2.1.4 Notions d'interconnection, de robustesse et de redondance des « voies d'internalisation ».....	37
2.2 L'ubiquitination comme signal d'internalisation	38
2.2.1 Mécanisme d'ubiquitination par les ubiquitine ligases E3 à domaine RING :	38
2.2.2 Fonction de l'ubiquitination dans le trafic membranaire :.....	40
2.3 Importance du trafic membranaire dans la régulation de la signalisation cellulaire en général et plus particulièrement pour la signalisation Notch.....	41
2.3.1 Trafic membranaire et signalisation cellulaire en général.....	41
2.3.2 Trafic membranaire et signalisation Notch.....	42
2.4 Rôles des ubiquitine ligases Neuralized et Mind bomb dans l'activité signalisatrice des ligands.....	43
2.4.1 Neuralized et Mind bomb sont nécessaires à des processus développementaux distincts, dépendant de la signalisation Notch.....	44
2.4.2 Neuralized et Mind bomb ont des activités moléculaires redondantes mais pas strictement identiques...	45
2.4.3 Que sait-on de la régulation des activités de Neuralized et Mindbomb ?.....	47
2.5 Les modèles d'activation de la signalisation par endocytose des ligands.....	48
2.5.1 Le modèle de la mécanotransduction.....	49
2.5.2 Le modèle de la maturation	50
2.5.3 L'endocytose des ligands est-elle toujours nécessaire à l'activation de Notch ?.....	50
<i>3 Fonction des glycosphingolipides et des domaines lipidiques enrichis en cholestérol et sphingolipides</i>	<i>52</i>
3.1 Généralité sur les membranes	52
3.2 Notion d'hétérogénéité latérale des membranes et implication des glycosphingolipides	56
3.3 Méthodes d'analyse de la composition et de la dynamique des domaines lipidiques dans les membranes biologiques.....	58
3.3.1 Méthodes d'isolation biochimique des domaines lipidiques résistants aux détergents	58
3.3.2 Des méthodes d'observation directe révèlent la dynamique de l'assemblage de ces domaines lipidiques.....	59
3.4 Comment est contrôlée la dynamique de la ségrégation des domaines lipidiques ?.....	60
3.5 La composition lipidique des membranes de cellules de drosophile est théoriquement compatible avec la formation de microdomaines lipidiques	61
3.6 Fonction des glycosphingolipides dans l'endocytose	62
3.6.1 Utilisation d'agents qui extraient ou séquestrent le cholestérol et d'analogues des GSLs.....	62

3.6.2	Suivie du trafic d'analogues de GSLs et de toxines.....	63
3.6.3	Analyse des conséquences de la modulation de la voie de biosynthèse des GSLs.....	64
	OBJECTIFS DE MA THESE	68
	CHAPITRE 1:.....	70
	UN CRIBLE GENETIQUE POUR IDENTIFIER DE NOUVEAUX REGULATEURS DU TRAFIC ET DE L'ACTIVITE SIGNALISATRICE DES LIGANDS DE NOTCH CHEZ LA DROSOPHILE	70
	RESUME DU CHAPITRE 1	72
	ARTICLE EN PRÉPARATION.....	76
	ANNEXES DU CHAPITRE 1.....	78
1	<i>Recherche des gènes responsables de l'interaction entre les 14 éléments GS et mib1</i>	78
1.1	Établissement d'une liste de gène candidats.....	78
1.2	Principe de la stratégie d'identification des gènes dont la surexpression est nécessaire au sauvetage du phénotype induit par Mib1 ^{C1205S}	80
1.3	Résultats de l'identification des interacteurs par RNAi.....	81
2	<i>Identification des gènes candidats qui présentent un phénotype en perte de fonction potentiellement lié à la signalisation Notch</i>	84
	CHAPITRE 2:.....	88
	ANALYSE DU ROLE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES DANS LA SIGNALISATION NOTCH CHEZ LA DROSOPHILE	88
	RESUME DU CHAPITRE 2.....	90
	ARTICLE PUBLIE DANS « THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY ».....	94
	ANNEXES DU CHAPITRE 2.....	96
1	<i>Résultats négatifs et/ou complémentaires à ceux présentés dans l'article</i>	96
1.1	Analyse du mutant $\alpha 4GT1$ et du double mutant $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$ en perte de fonction zygotique et maternelle.....	96
1.2	Utilisation du test de compétition pour l'adoption du destin SOP pour tester le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch.....	98
1.2.1	Le principe.....	98
1.2.2	Les résultats.....	99
1.3	La localisation subcellulaire de Dl et Ser n'est pas affectée par la perte d'activité $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$, ni par la surexpression d' $\alpha 4GT1$	101
1.4	L'endocytose de Dl dans des endosomes Rab5 est bloquée par le dominant négatif Mib1 ^{C1205S} , et ce blocage est levé par l'expression d' $\alpha 4GT1$	103
2	<i>Delta est détecté dans des domaines membranaires résistants à la solubilisation par le Brij98, dans l'embryon</i>	105
2.1	Le choix de l'embryon.....	106
2.2	Le protocole.....	106
2.3	Les résultats.....	106
2.4	Remarques concernant les contrôles de cette expérience.....	107
3	<i>Analyse de la fonction d'egghead et brainac dans la signalisation Notch et dans le maintien de la polarité apico-basale chez l'embryon</i>	108
3.1	Analyse du rôle d'egghead et brainac dans la signalisation Notch.....	108
3.2	Analyse du phénotype embryonnaire de brn^{fs107}	111
3.2.1	Le phénotype de cuticule atrophiée de la perte de fonction maternelle de brainac n'est pas corrélé à un phénotype neurogénique.....	111
3.2.2	en revanche, la polarité apico-basale des cellules de l'ectoderme est perturbée dans le mutant brn^{fs107}	112
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	116
1	<i>Tests d'endocytose in vivo</i>	116
1.1	Test d'endocytose dans le notum –Figure 5 de l'annexe du chapitre 2.....	116
1.2	Test d'endocytose dans le notum avec un anticorps anti-Delta directement couplé à un fluorochrome (kit Zenon, Figure 5 D de l'annexe du chapitre 2).....	117
1.3	Particularités du test d'endocytose sur disque imaginal d'aile.....	118

2	Construction des plasmides <i>p(MT)WB-Ser[1-288]-6xHis</i> et <i>p(MT)WB-Ser[1-288]^{W/A}-6xHis</i> qui vont permettre l'expression inductible en cellule S2 des polypeptides <i>SerNter</i>	118
3	Production des polypeptides <i>Ser[1-288]</i> et <i>Ser[1-288]^{W/A}</i> en cellules S2 et purification.....	121
4	Préparation de DRM d'embryons de drosophile sur gradient de sucrose.....	122
CONCLUSIONS ET DISCUSSION		124
1	Analyse des résultats du crible.....	126
1.1	Les avantages et les inconvénients d'une approche en gain de fonction	126
1.2	L'effet d'interférence des GS sur l'expression des gènes adjacents orientés dans le sens inverse des promoteurs des GS a-t-il été sous-estimé ?	127
1.3	Rôle potentiel de Hsc70-4 dans le trafic et la signalisation des ligands de Notch	129
1.4	Rôle potentiel de Tacc dans le trafic et la signalisation des ligands de Notch	130
2	Analyse du rôle d' <i>α4GT1</i> dans la signalisation Notch	131
2.1	<i>α4GT1</i> est un régulateur positif de la signalisation Notch	131
2.2	La fonction d' <i>α4GT1</i> dans la signalisation Notch implique la production du GSL N5	131
2.3	Même s'il ne semble pas essentiel, le rôle modulateur des GSLs dans la signalisation Notch est conservé à travers l'évolution	132
2.4	Comment expliquer que l'absence d' <i>α4GT1</i> n'ait pas de conséquences ?.....	133
2.5	<i>α4GT1</i> agit-il sur la signalisation Notch au niveau de la cellule signalisatrice et des ligands, ou au niveau de la cellule signalisatrice et du récepteur Notch ?.....	133
2.6	Comment l'augmentation du niveau de N5 peut-il compenser la réduction d'activité ubiquitine ligase et restaurer l'endocytose et l'activité signalisatrice des ligands ?.....	134
2.6.1	L'augmentation du niveau de N5 pourrait avoir un effet général sur l'endocytose.....	135
2.6.2	L'augmentation du niveau de N5 pourrait indirectement permettre de restaurer l'ubiquitination des ligands	135
2.6.3	L'augmentation du niveau de N5 pourrait favoriser le regroupement des ligands dans des nanodomains membranaire et faciliter leur endocytose.....	136
2.7	Comment tester <i>in vivo</i> la fonction du GBM des ligands ?	136
2.7.1	Peut-on tout d'abord, mettre en évidence <i>in vivo</i> une interaction entre le GBM des ligands et les GSLs ?	136
2.7.2	Le GBM est-il impliqué dans l'endocytose des ligands ?	137
3	Le rôle de <i>brainiac</i> dans le maintien de la polarité apicale	138
REFERENCES		140

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

FIGURE 1 : LA « VOIE DE SIGNALISATION » CANONIQUE NOTCH ET SES PRINCIPAUX ACTEURS.....	15
FIGURE 2 : EXEMPLES DE ROLES RESTRICTIF ET INDUCTIF DE LA SIGNALISATION NOTCH AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA DROSOPHILE	20
FIGURE 3 : STRUCTURES DES RECEPTEURS NOTCH ET DE LEURS LIGANDS.....	25
FIGURE 4 : STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA REGION NRR (REGION DE REGULATION NEGATIVE) DE LA PROTEINE NOTCH2 HUMAINE.....	27
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TRAFIC MEMBRANAIRE D'UNE CELLULE.....	33
FIGURE 6 : CYCLE D'ACTIVITE DES RAB ET FORMATION D'UN DOMAINE RAB5.....	37
FIGURE 7 : UBIQUITIATION D'UN SUBSTRAT NECESSITE LA COLLABORATION DE TROIS ENZYMES, UNE ENZYME DITE ACTIVATRICE, L'E1, UNE ENZYME DE CONJUGAISON, L'E2 ET UNE UBIQUITINE LIGASE, E3.....	39
FIGURE 8 : MIB1 ET NEUR SONT DEUX UBIQUITINE LIGASES E3 DIFFERENTES DE LA FAMILLE DES RING FINGER ..	44
FIGURE 9 : MIB1 ET NEUR JOUE DES ROLES DISTINCTS DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA DROSOPHILE	45
FIGURE 10 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DES DEUX TYPES DE MODELES PERMETTANT D'EXPLIQUER LE ROLE DE L'ENDOCYTOSE DES LIGANDS DANS L'ACTIVATION DU RECEPTEUR NOTCH.....	49
FIGURE 11 : LA BICOUCHE LIPIDIQUE	52
FIGURE 12 : LES DIFFERENTES CATEGORIES DE PROTEINES MEMBRANAIRES.....	53
FIGURE 13 : LES DIFFERENTES CATEGORIES DE LIPIDES	54
FIGURE 14 : LA DIMINUTION DU CHOLESTEROL A DES EFFETS SIMILAIRES SUR LES PHENOMENES DE SEGREGATION DE PHASE DANS LES MEMBRANES MODELES ET DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES.	57
FIGURE 15 : RECONSTITUTION DE LA FORMATION DE TUBULES SUR DES MEMBRANES SYNTHETIQUES PAR LA TOXINE SHIGA	64
FIGURE 16 : VOIES DE BIOSYNTHESES DES CERAMIDES ET DES GLYCOSPHINGOLIPIDES.....	66

Annexes du chapitre 1

FIGURE 1: REPRESENTATION DU POINT D'INSERTION D'UN ELEMENT GS BIDIRECTIONNEL FICTIF ET DE LA STRATEGIE D'IDENTIFICATION DU GENE RESPONSABLE DU SAUVETAGE DU PHENOTYPE INDUIT PAR MIB1 ^{C1205S}	80
FIGURE 2 : IDENTIFICATION DES GENES DONT LA SUREXPRESSION EST NECESSAIRE AU SAUVETAGE DU PHENOTYPE INDUIT PAR MIB1 ^{C1205S}	83
FIGURE 3 : PHENOTYPES RNAI DES GENES CANDIDATS DANS L'AILE ET LE NOTUM	86

Annexes du chapitre 2

FIGURE 1: ANALYSE DE LA VIABILITE DE LA PERTE DE FONCTION MATERNEL D'A4GT1 ET DU DOUBLE MUTANT A4GT1 A4GT2	97
FIGURE 2: LA PERTE DE FONCTION ZYGOTIQUE D'A4GT1 PRESENTE UN PHENOTYPE DE SOIE SENSORIEL AVEC UNE FAIBLE PENETRANCE.....	98
FIGURE 3 : ANALYSE DE L'INFLUENCE DE LA MODULATION DES GSLs DANS LA COMPETITION POUR LE DESTIN SOP AU COURS DE L'INHIBITION LATERALE	100
FIGURE 4: LA LOCALISATION DE DELTA ET SERRATE N'EST PAS AFFECTEE PAR LA PERTE OU LE GAIN D'ACTIVITE A4GT1.....	102
FIGURE 5 : L'ENDOCYTOSE DE DL DANS DES ENDOSOMES RAB5 EST INHIBEE PAR LE DOMINANT NEGATIF MIB1 ^{C1205S} ET CETTE INHIBITION EST SAUVEE PAR L'EXPRESSION D'A4GT1.....	104

FIGURE 6 : DL ET SYNT1A SONT DETECTES DANS LES FRACTIONS LEGERES 2-3, ALORS QUE NOTCH EST A LA FOIS DANS LES FRACTIONS LEGERES 2-3 ET LES FRACTIONS LOURDES 8-9-10	107
FIGURE 7 : LA SUREXPRESSION D'EGH ET BRN NE SAUVE PAS LE PHENOTYPE INDUIT PAR MIB1 ^{C1205S} DANS L'AILE ET LES MUTANTS NE PRESENTENT PAS DE PHENOTYPE EVIDENT D'INHIBITION LATERALE	109
FIGURE 8 : LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES LIGANDS EST INCHANGEE DANS LES CELLULES EGH, ET LES CELLULES BRN PAR RAPPORT AUX CELLULES SAUVAGES.....	110
FIGURE 9 : LE DEFAUT DE CUTICULE OBSERVE DANS LES EMBRYONS BRN N'EST PAS CORRELE A UN PHENOTYPE NEUROGENIQUE.....	112
FIGURE 10 : LA LOCALISATION APICALE DE PATJ EST PERTURBEE DANS CERTAINES CELLULES DU NEURECTODERME DES EMBRYONS BRN ALORS QUE LE MARQUEUR BASOLATERAL DISC LARGE N'EST PAS PERTURBE.....	114

Matériels et méthodes

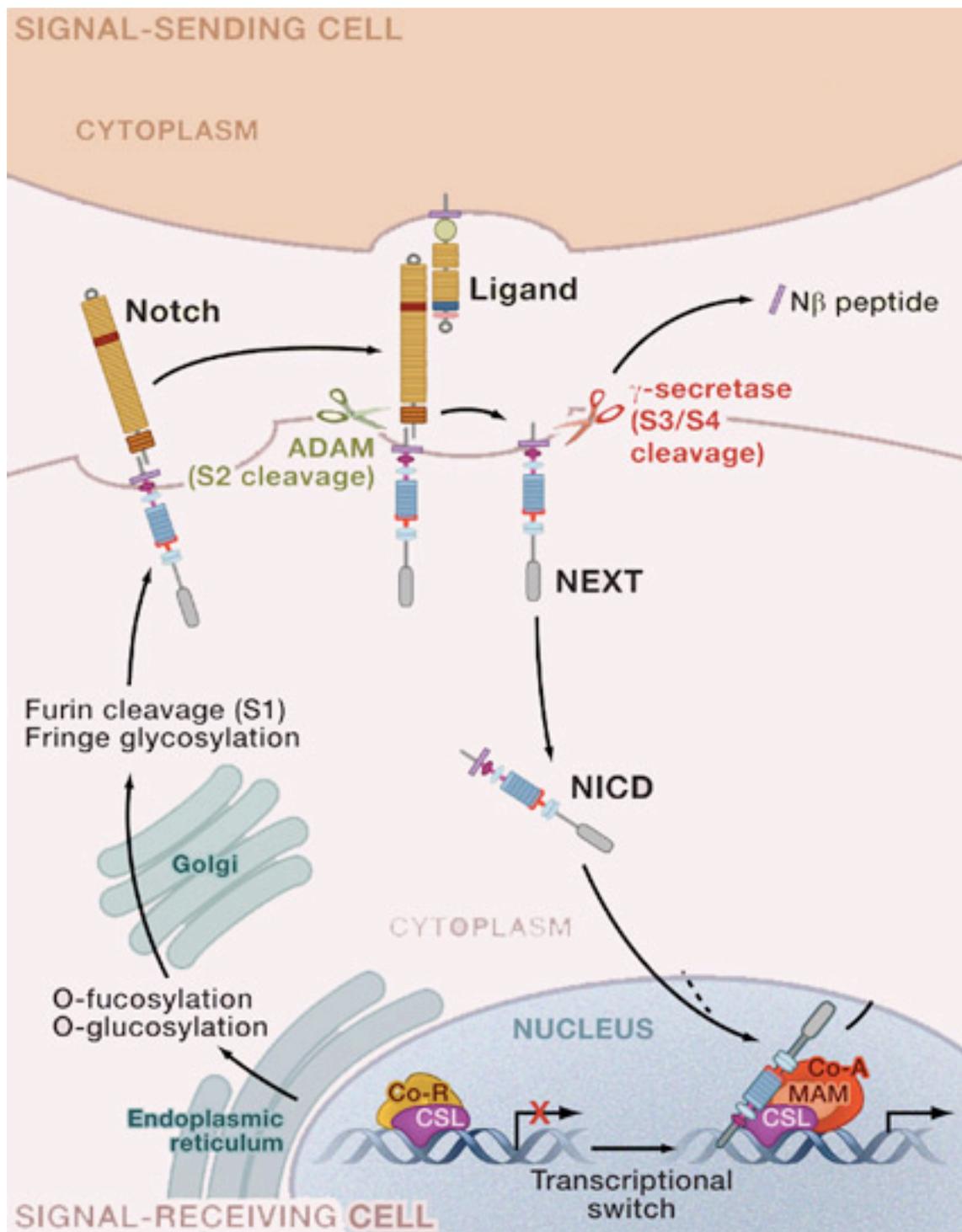
FIGURE 11: CONSTRUCTION DES PLASMIDES PLASMIDES P(MT)WB-SERNTER ^{GBM+} -6XHIS ET P(MT)WB-SERNTER ^{GBM W/A} -6XHIS.....	120
FIGURE 12 : PROFILE DE MIGRATION DES POLYPEPTIDES SERNTER ^{GBM+} ET SERNTER ^{GBM W/A} APRES PURIFICATION ET CONCENTRATION (REVELE PAR UNE COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE)	121

Introduction

Le devenir d'une cellule au sein d'un organisme multicellulaire dépend de sa capacité à percevoir, intégrer et répondre correctement à son environnement. À toutes les étapes du développement, les cellules émettent et reçoivent des signaux indispensables à leur bon fonctionnement ainsi qu'à leur coordination spatiale et temporelle au sein de l'organisme. La perception des signaux extérieurs est permise par des récepteurs protéiques en général membranaires, activables par des ligands spécifiques. La transduction de ces signaux est ensuite assurée par différents réseaux de molécules regroupées en « voies de signalisation » qui transmettent et traduisent le signal et permettent à la cellule d'y répondre en modifiant par exemple le patron d'expression de certains gènes cibles.

La membrane plasmique constitue l'interface entre la cellule et son environnement et joue donc un rôle primordial dans la signalisation cellulaire médiée par des récepteurs et/ou des ligands membranaires. L'endocytose correspond à l'internalisation d'une petite partie de la membrane plasmique et des protéines qui lui sont associées dans un compartiment interne appelé endosome, et le trafic membranaire permet d'adresser ces protéines, ou cargos, à différents compartiments membranaires pour en réguler l'activité. Trafic membranaire et signalisation cellulaire sont des processus intimement liés et interdépendants.

Je présente donc dans l'introduction la voie de signalisation par le récepteur Notch, ses principaux acteurs, son importance chez les métazoaires ainsi que ses mécanismes de régulation. Je me focalise ensuite dans une deuxième partie sur le rôle de l'ubiquitination et de l'endocytose des ligands de Notch dans leur activité signalisatrice après avoir brièvement introduit les notions d'endocytose et d'ubiquitination. Enfin, mes résultats m'ayant mené vers l'analyse du rôle des glycosphingolipides dans la signalisation Notch, la dernière partie de l'introduction est consacrée aux fonctions connues des glycosphingolipides et des domaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides.



Source (Kopan and Ilagan 2009)

Figure 1 : La « voie de signalisation » canonique Notch et ses principaux acteurs

1. La signalisation par le récepteur Notch et ses différents niveaux de régulation

La signalisation par le récepteur Notch correspond à un ensemble d'acteurs moléculaires conservés chez les métazoaires. Elle est établie entre deux cellules en contact physique. Les ligands de Notch, exprimés dans la cellule signalisatrice, sont transmembranaires et activent le récepteur au niveau de la cellule réceptrice adjacente. Notch est à la fois un récepteur transmembranaire et un régulateur transcriptionnel et son activation permet d'activer l'expression de ses gènes cibles. La signalisation par le récepteur Notch contrôle ainsi selon le contexte tissulaire la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire. Elle est impliquée dans un très grand nombre de processus développementaux ainsi que dans la maintenance des tissus adultes.

Je commence par présenter brièvement les principaux acteurs de la signalisation Notch, pour ensuite développer son implication dans différentes pathologies humaines et ses rôles au cours du développement. Je reviens ensuite plus en détails sur les étapes de la transduction du signal de la membrane au noyau, pour finir sur les différents mécanismes de contrôle de l'activité du récepteur Notch.

1.1 Les principaux acteurs de la signalisation canonique par le récepteur Notch

La signalisation Notch est établie entre deux cellules en contact physique : la cellule signalisatrice qui exprime les ligands et la cellule réceptrice qui exprime le récepteur Notch. Après sa traduction, la protéine Notch est glycosylée par différentes enzymes, et ces modifications post-traductionnelles sont indispensables au bon fonctionnement du récepteur et à la modulation de l'affinité du récepteur pour certains de ses ligands (voir la partie 1.5.3 pour plus de détails sur la régulation de l'interaction ligand-récepteur par glycosylation). Le récepteur est ensuite clivé au site S1 par une Furin

et adressé à la membrane plasmique sous la forme d'un hétérodimère maintenu par des interactions non-covalentes.

Le récepteur Notch est activé par l'interaction avec ses ligands DSL (Delta/ Serrate/ LAG-2) présentés par une cellule voisine (voir la partie 1.4.2 pour plus de détails sur les différents ligands de Notch). L'endocytose et le trafic membranaire régulent la disponibilité et l'activité des ligands et du récepteur à la surface des cellules. Ils font l'objet de la partie 2 de l'introduction. L'interaction ligand/récepteur induit une série de clivages protéolytiques qui activent le récepteur. Le clivage en S2 est réalisé par les métalloprotéases de la famille ADAM et génère une forme tronquée de Notch, toujours ancrée à la membrane appelée NEXT. NEXT est ensuite coupé par le complexe de la γ -sécrétase aux sites S3 et S4, à la surface de la cellule et/ou dans des endosomes, ce qui libère la partie intracellulaire de Notch (NICD) dans le cytoplasme.

NICD, qui correspond à la forme activée du récepteur, est ensuite transféré dans le noyau. NICD s'associe à la protéine CSL (CBF1/RBP_{jk}/Su(H)/Lag-1) qui se lie à l'ADN. En l'absence de NICD, CSL s'associe à des co-répresseurs ubiquitaires (Co-R) et des déacétylase d'histone (HDACs) pour réprimer la transcription des gènes cibles. En revanche, l'interaction avec NICD induit un changement allostérique de CSL qui facilite le déplacement des répresseurs transcriptionnels. Le co-activateur transcriptionnel Mastermind (MAM) reconnaît alors le complexe NICD/CSL et recrute d'autres co-activateurs transcriptionnels (Co-A) pour activer la transcription des gènes cibles qui varient selon le contexte.

1.2 Implication de la signalisation Notch dans différentes pathologies humaines

La signalisation Notch intervient tout au long du développement de l'organisme mais aussi lors de la maintenance des tissus adultes. A cause de son rôle critique dans le développement de nombreux tissus, des activations ou des inactivations aberrantes du récepteur Notch sont liées à diverses pathologies humaines (Gridley 2003).

Ces pathologies incluent des syndromes développementaux comme :

- le syndrome Alagille, qui associe des défauts de développement des voies biliaires, une cardiopathie congénitale et une déformation des vertèbres à des mutations dans le ligand de Notch JAGGED1 (Li, Krantz et al. 1997) (Oda, Elkahloun et al. 1997);
- le syndrome CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarct and leukoencephalopathy), où des mutations dans la partie extracellulaire de NOTCH3 prédisposent les malades à des formes de démences, à des migraines et à des accidents vasculaires cérébraux (Joutel, Corpechot et al. 1996);
- certaines formes de dysostoses spondylo-costales associées à des mutations dans le ligand de Notch DELTA LIKE 3 (Bulman, Kusumi et al. 2000) qui sont des anomalies de la segmentation vertébrale et costale parfois accompagnées de malformations viscérales ;
- la tétralogie de Fallot, une cardiopathie congénitale;
- ou encore la maladie familiale de la valve aortique.

La signalisation Notch régulant aussi le renouvellement des tissus adultes, des dérégulations de la signalisation Notch sont par conséquent intimement liées à différents cancers. Plus de 50% des leucémies lymphoblastiques aigues à cellules T (T-ALL) sont ainsi associées à des réarrangements chromosomiques induisant l'activation constitutive du récepteur Notch (Weng and Aster 2004) (Ellisen, Bird et al. 1991). Beaucoup d'autres cancers comme certains neuroblastomes, certains cancers du sein, de la peau, du poumon et de la prostate sont corrélés avec des altérations de l'expression de Notch et/ou de ses ligands, même si le lien de cause à effet n'est pas toujours clairement établi.

Différentes oncoprotéines virales produites par le virus Epstein-Barr (EBV), le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) et l'adénovirus de type 5, se fixent au facteur de transcription CSL et modulent la transcription des gènes cibles de l'hôte et du virus de façon indépendante de Notch (Allenspach, Maillard et al. 2002). La plupart de ces infections sont latentes dans les lymphocytes B, voire asymptomatiques, mais chez les individus immunodéficients, elles peuvent entraîner des cancers.

L'élucidation des mécanismes moléculaires de ces différentes maladies est maintenant à l'origine d'outils de diagnostique et est pertinent pour la mise en place de stratégies thérapeutiques. La recherche portant sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'activation du récepteur Notch a donc un intérêt aussi bien fondamental que clinique.

1.3 Rôles de la signalisation par le récepteur Notch au cours du développement

La signalisation par le récepteur Notch est utilisée de façon répétée au cours du développement embryonnaire des métazoaires pour contrôler la mise en place des patrons de la plupart des tissus, et avec des effets différents sur la spécification des destins cellulaires, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, l'adhésion, la migration cellulaire etc... Il est difficile de faire une liste exhaustive des processus développementaux régulés par la signalisation Notch. On peut citer par exemple :

-chez la drosophile : l'inhibition de la neurogenèse, la régulation de la gliogenèse et des lignages neuraux, l'inhibition de la formation des veines de l'aile, l'inhibition de la myogenèse, l'induction du mesectoderme, de la marge de l'aile, des segments de la patte, de la polarité dorso-ventral de l'œil, ou encore de la régulation de l'hématopoïèse...

-chez les vertébrés : l'inhibition de la neurogenèse, la régulation des destins cellulaires dans l'oreille interne, l'inhibition de la myogenèse, l'induction de l'asymétrie droite/gauche, la régulation du développement des membres, de la somitogenèse, de la lymphopoïèse, du développement vasculaire, du développement des reins, etc...

Ces différentes fonctions de la signalisation Notch peuvent toutefois être regroupées en deux types de processus en fonction de l'effet inductif ou restrictif de l'activation de Notch sur les destins cellulaires :

-Le premier correspond à la restriction d'un destin cellulaire dans un groupe de cellules équipotentes au cours de l'inhibition latérale.

-Le second correspond à l'induction d'un nouveau destin cellulaire à la frontière entre deux populations de cellules.

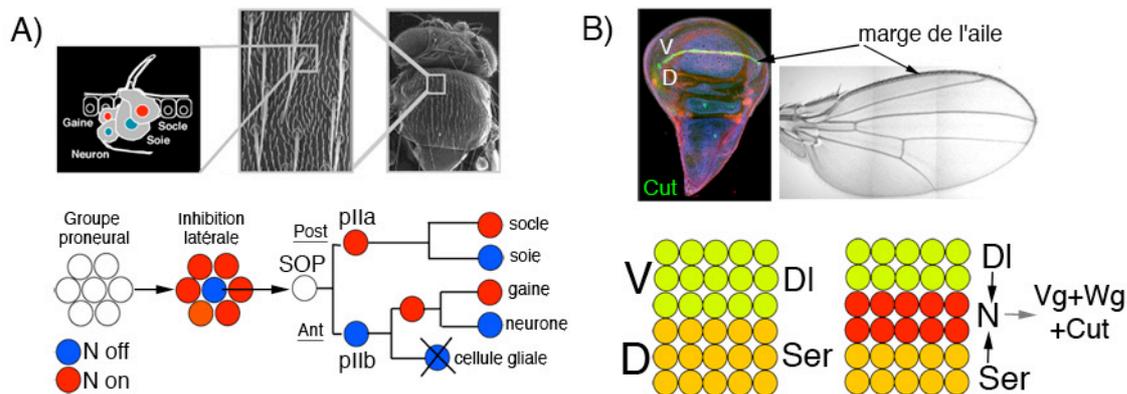


Figure 2 : Exemples de rôles restrictif et inductif de la signalisation Notch au cours du développement de la drosophile

A : L'inhibition latérale permet d'organiser l'espacement régulier des soies sensorielles sur le notum de drosophile. Chaque soie sensorielle est un organe composé de quatre cellules, deux externes, la soie et la cellule socle et deux internes, la gaine et le neurone, la cellule gliale disparaissant par apoptose. Les précurseurs d'organe sensoriel ou SOP sont sélectionnés au sein d'un groupe de cellules proneurales qui ont toutes la possibilité de devenir des cellules épidermales ou neurales. La sélection de la SOP dans le groupe proneural est le résultat d'une compétition remportée par la cellule qui activera le plus le récepteur Notch chez ces voisines (N on, rouge ; N off bleu) et réprimera ainsi leur programme de différenciation neural. La SOP subit ensuite une série de divisions asymétriques pour produire les différentes cellules qui composent la soie sensorielle. Les décisions binaires de destin cellulaire qui ont lieu après ces divisions sont aussi régulées par la signalisation Notch qui restreint le destin neural. L'activation du récepteur Notch est bloquée et l'activité signalisatrice de DI est activée dans la cellule fille pIIb, ce qui permet d'activer Notch dans une cellule (pIIa, rouge) et de l'inhiber dans l'autre (pIIb, bleu).

B : L'activation de Notch à la frontière entre les compartiments dorsal et ventral du disque imaginal d'aile permet l'induction des cellules de la marge qui correspondent à un centre organisateur de l'aile et contrôle sa croissance. Le ligand Serrate actif dans les cellules dorsales (en jaune) active Notch dans les cellules ventrales adjacentes, et réciproquement, le ligand DI actif dans les cellules ventrales (en vert) active Notch dans les cellules dorsales adjacentes. Notch est donc symétriquement activé à la frontière dorso-ventrale. L'activation de Notch induit la différenciation en cellules de marge qui expriment les marqueurs *vestigial*, *wingless* et *cut*.

1.3.1 Exemple d'un rôle restrictif de la signalisation Notch : la mise en place des soies mécanosensorielles sur le notum de drosophile

L'inhibition latérale est un processus qui empêche que trop de cellules qui ont l'opportunité d'adopter un destin cellulaire ne le fassent. Elle contrôle par exemple le choix d'une cellule entre un destin neural et un destin épidermal, et restreint le nombre de cellules progénitrices neurales mais aussi musculaires pendant le développement de la drosophile (Hartenstein, Rugendorff et al. 1992) et celui des vertébrés (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999).

Je détaille ici le rôle de la signalisation Notch dans la mise en place de soies mécanosensorielles régulièrement espacées sur le thorax de la drosophile (Figure 2A) :

Les précurseurs d'organe sensoriel (SOP) sont sélectionnés au sein d'un groupe de cellules proneurales qui ont toutes la possibilité de devenir des SOP car elles expriment les activateurs transcriptionnels bHLH (basic helix-loop-helix) aussi appelés proneuraux. La signalisation Notch restreint la différenciation neurale en réprimant l'expression des gènes proneuraux (Parks, Huppert et al. 1997). La sélection de la SOP dans le groupe proneural est le résultat d'une compétition (Heitzler and Simpson 1991). Toutes les cellules du groupe proneural expriment initialement le même niveau de Notch et de ligand et inhibent mutuellement leur potentiel destin SOP. L'activation de Notch dans une cellule donnée, réprime sa différenciation en SOP et un rétrocontrôle négatif sur l'expression (Heitzler, Bourouis et al. 1996) (Huppert, Jacobsen et al. 1997) et l'activité (Leviten, Lai et al. 1997) (Lai, Bodner et al. 2000) (Bardin and Schweisguth 2006) (Chanet, Vodovar et al. 2009) du ligand diminue sa capacité à activer Notch en retour chez ses voisines, ce qui assure qu'une seule cellule, celle qui présente le plus faible niveau d'activation de Notch, émerge de la compétition avec un destin SOP.

Ainsi, la réduction de la signalisation Notch, au niveau des cellules du groupe proneural au moment de la spécification des SOP, entraîne un excès de différenciation en SOP, on parle alors de phénotype neurogénique. Au contraire, une activation constitutive de la signalisation Notch a un effet inverse et empêche la différenciation en SOP.

La SOP subit ensuite une série de divisions asymétriques pour produire les différentes cellules qui composent la soie sensorielle (Figure 2 A). La répartition inégale de régulateurs de la signalisation Notch régule les décisions binaires de destin cellulaire qui ont lieu lors de ces divisions asymétriques et permet d'activer Notch dans une des deux cellules filles à chaque fois et d'inhiber son potentiel neural (Parks, Huppert et al. 1997) (Roegiers and Jan 2004).

Un défaut d'activité Notch entraîne ainsi la spécification de deux pIIb qui donneront à leur tour des neurones, alors qu'une activation ectopique de Notch entraîne la spécification de deux pIIa qui produiront potentiellement quatre cellules socles.

1.3.2 Exemple d'un rôle inductif de la signalisation Notch: la mise en place de la marge de l'aile chez la drosophile

La signalisation par le récepteur Notch permet aussi la spécification d'un nouveau destin cellulaire à la frontière de deux populations de cellules distinctes. Ce rôle est primordial lors de la somitogenèse chez les vertébrés et de la mise en place des appendices aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés.

Je détaille ici le rôle inductif de la signalisation Notch dans le contexte du développement de l'aile de drosophile et de la mise en place de la marge (Figure 2B).

Dans ce cas, l'activation de la signalisation Notch entre le compartiment dorsal et le compartiment ventral de la future aile permet la spécification de la marge de l'aile, une rangée de cellules qui joue le rôle de centre organisateur et contrôle la croissance du tissu (Micchelli, Rulifson et al. 1997).

La frontière entre les compartiments dorsal et ventral du disque d'aile est établie au cours du premier stade larvaire par l'expression dorsale d'*apterous* (Klein 2001). *Apterous* active l'expression, dans les cellules dorsales, du ligand de Notch : *Serrate*. Chez la drosophile le récepteur Notch a deux ligands, *Delta* (DI) et *Serrate* (Ser), et à ce stade, l'expression du ligand DI et du récepteur Notch est ubiquitaire dans le disque d'aile.

Apterous active aussi l'expression, dans les cellules dorsales, de la glycosyltransferase Fringe. Fringe glycosyl Notch et augmente sa capacité à être activé par Delta plutôt que par Serrate (voir la partie 1.5.3 pour plus de détails sur le rôle de Fringe) (Rauskolb, Correia et al. 1999) (Irvine 1999). Ser dans les cellules dorsales active donc Notch dans les cellules ventrales directement adjacentes. Réciproquement Dl dans les cellules ventrales active Notch dans les cellules dorsales adjacentes. Notch est donc principalement activé de façon symétrique à la frontière dorso/ventrale (de Celis, Garcia-Bellido et al. 1996) (Doherty, Feger et al. 1996) (Micchelli, Rulifson et al. 1997). L'activation de Notch active l'expression de gènes cibles qui spécifient les cellules de la marge de l'aile comme *vestigial*. *vestigial*, *wingless* et *cut* sont des marqueurs de la marge couramment utilisés.

Un défaut d'activation de Notch, dans un groupe de cellules à la frontière dorso/ventrale, empêche la spécification des cellules de la marge, l'expression du marqueur Cut, et la croissance du tissu entraînant la formation d'une encoche dans l'aile adulte. Au contraire, une activation ectopique de Notch provoque la spécification de cellules de marge ectopiques.

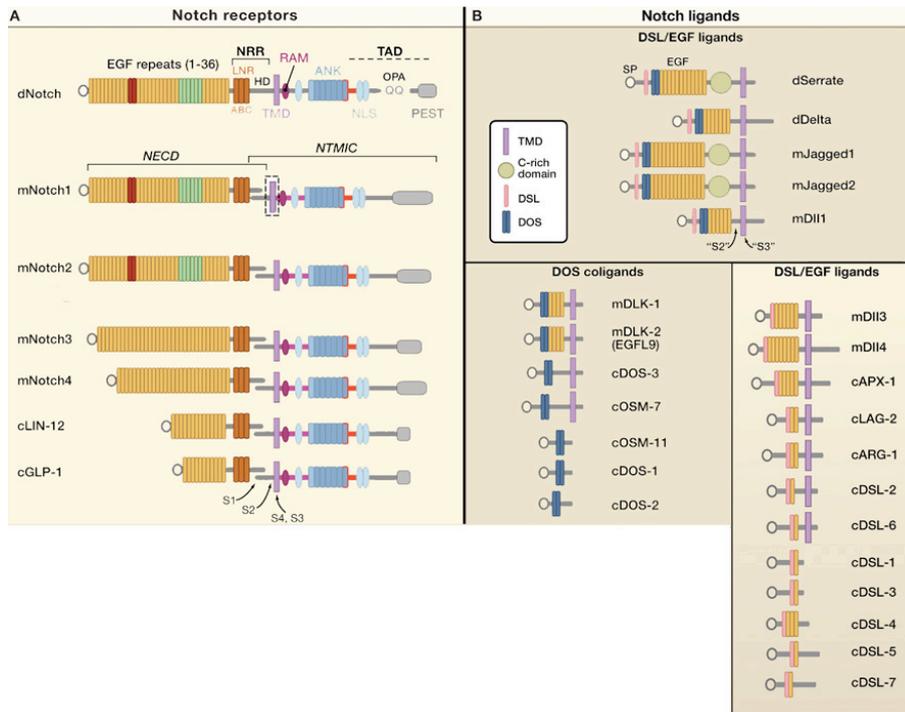
1.4 Les bases moléculaires de l'activation du récepteur Notch par les ligands DSL

Le récepteur Notch intègre l'interaction avec les ligands à la membrane plasmique de la cellule et la régulation transcriptionnelle des gènes cibles dans le noyau (Figure 1). Pour cela les ligands induisent le clivage protéolytique de Notch et libèrent son domaine intracellulaire (NICD). NICD correspond à la forme activée de Notch qui porte l'activité transcriptionnelle. Le signal est donc transmis directement au noyau sans relais de second messager. Le clivage étant irréversible, chaque molécule de récepteur ne signale qu'une seule fois.

1.4.1 Structure du récepteur Notch

Le récepteur Notch est une grande protéine transmembranaire de type I (Figure 3A). La drosophile ne possède qu'un récepteur Notch, il y en a deux chez *C. elegans*, et quatre paralogues chez les mammifères qui ont à la fois des fonctions uniques et des fonctions redondantes. Sa partie extracellulaire comprend une série de 29 à 36 tandems de répétitions EGF like (pour epidermal growth factor) qui pour certaines sont indispensables à l'interaction avec les ligands. Toujours dans la partie extracellulaire de Notch, les EGFR sont suivies par une région de régulation négative (NRR pour negative regulatory region, Figure 3A) qui est composée de 3 répétitions riches en cystéine (LNR pour cysteine-rich Lin12-Notch repeats) et d'un domaine d'hétérodimérisation. Cette région de régulation négative empêche l'activation de Notch en l'absence de ligands. Notch est clivé lors de son adressage à la membrane par une convertase furin-like au site S1. Ce clivage convertit Notch en un hétérodimère NECD-NTMIC (pour Notch ExtraCellular Domain-Notch TransMembrane and Intracellular domain). Les deux sous-unités sont maintenues ensemble par des interactions non-covalentes du domaine d'hétérodimérisation.

Du côté intracellulaire, on trouve : un domaine RAM (pour RBPjk association module) qui constitue un module d'interaction protéique, une région sans structure particulière, une séquence de localisation nucléaire, sept répétitions ankyrin (ANK pour ankyrin repeat domain), puis encore une séquence de localisation nucléaire, un domaine de transactivation mal défini et peu conservé, et enfin un motif PEST (pour proline/glutamic acid/serin/threonine-rich) qui contient des signaux de dégradation et régule la stabilité de NICD.



Source : (Kopan and Ilagan 2009)

Figure 3 : Structures des récepteurs Notch et de leurs ligands

A : Les récepteurs Notch sont de grandes protéines transmembranaïres de type I composées dans sa partie extracellulaire d'une série de répétition EGF-like (EGFR). Le Notch de drosophile et les 4 Notch de mammifères (mNotch 1-4) ont un nombre variable de EGFR, et sont beaucoup plus longs que les 2 Notch chez *C. elegans* (cLIN-12 et cGLP-1). Les EGFR en rouge (11-12) et en vert (24-29) sont impliquées dans l'interaction avec les ligands. Les EGFR contiennent des sites consensus de O-fucosylation (par O-fut) et de O-glycosylation (par Rumi). Les répétitions EGF sont suivies par le domaine de régulation négative (NRR) composé de 3 répétitions Lin12-Notch (LNR-A, -B et -C) riches en cystéines et du domaine d'hétéro-dimérisation (HD). Notch est ensuite composé d'un domaine transmembranaïre (TMD), d'un domaine RAM (RBP_{jk} association module), de séquences de localisation nucléaire (NLSs), de 7 répétitions ankyrin (ANK) et d'un domaine de transactivation (TAD) qui contient des motifs PEST. Contrairement au Notch de drosophile, les protéines Notch de mammifères sont clivées par les convertases apparentées aux furines au site S1, ce qui converti Notch en un hétérodimère NECD-NTMIC (Notch extracellular domain-Notch transmembrane and intracellular domain) qui est maintenu par des liaisons non-covalentes du domaine d'hétérodimérisation. Après interaction avec les ligands, Notch est clivé en S2 par des metalloprotéases, puis par le complexe γ -sécrétase aux sites S3-S4.

B : Les ligands de Notch peuvent être divisés en catégories selon leur structure. Les ligands classiques DSL contiennent les domaines DSL (Delta/Serrate/LAG-2), DOS (Delta and OSM-11 like proteins), et EGF (epidermal growth factor). Ils n'existent pas chez *C. elegans*. Chez *C. elegans* et chez les mammifères, les ligands DSL n'ont pas de domaine DOS, et réciproquement les ligands DOS n'ont pas de DSL. Certain ligands n'ont pas de domaine transmembranaïre et sont solubles.

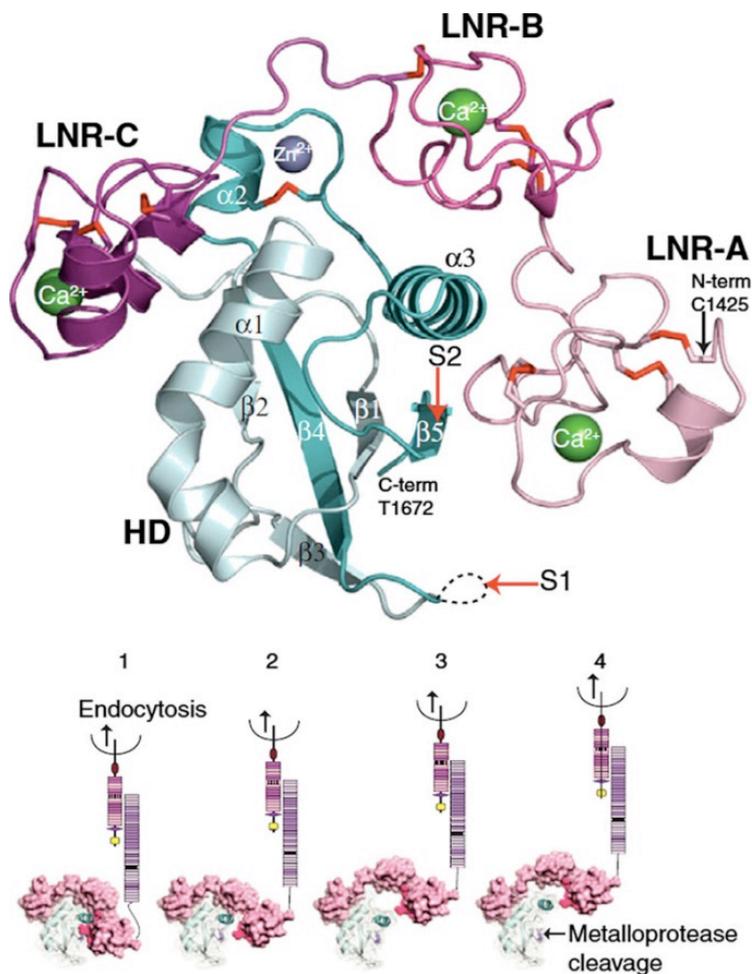
1.4.2 Les ligands DSL induisent un changement de conformation du récepteur qui permet son activation

La plupart des ligands de Notch sont aussi des protéines transmembranaires de type I. Les différentes catégories sont caractérisées par trois domaines structuraux (Figure 3 B) : le domaine DSL (pour Delta/Serrate/LAG-2), le domaine DOS (pour Delta and OSM-11 like protein, (Komatsu, Chao et al. 2008) qui correspond à un tandem de répétitions EGF spécialisées, et des répétitions EGF. Les ligands DSL peuvent aussi être classifiés sur la base de la présence (Jagged/Serrate) ou l'absence (Delta) d'un domaine riche en cystéine dont la fonction n'est pas connue. Les domaines DSL et DOS sont tous deux impliqués dans l'interaction avec le récepteur. D'autres protéines sans domaines DSL ni DOS sont capables d'activer Notch et sont des ligands non-canoniques dont la fonction et la structure sont moins bien caractérisées.

Le récepteur Notch est activé par deux clivages protéolytiques successifs (Bray 2006). Le premier clivage est induit par l'interaction avec les ligands. Il est réalisé au site S2 par les protéases de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease, Kuzbanian chez la drosophile). S2 est situé dans la région de régulation négative (NRR) qui a un effet autoinhibiteur sur l'activité du récepteur et empêche sa protéolyse en absence de ligand. Lorsque la structure de la NRR est perturbée par des mutations ponctuelles (Weng, Ferrando et al. 2004), une intégration virale (Girard, Hanna et al. 1996) ou encore un anticorps agoniste (Li, Li et al. 2008), Notch est constitutivement activé. L'analyse par cristallographie de la structure de la NRR ((Gordon, Vardar-Ulu et al. 2007), Figure 4) a révélé que le site S2 était enfouis dans une poche qui le rend inaccessible aux métalloprotéases. Le clivage de Notch au site S2 nécessite donc un changement de conformation du récepteur induit par l'interaction avec les ligands. Le produit de ce clivage est un intermédiaire de Notch ancré à la membrane appelé NEXT (pour Notch EXtracellular Truncation).

Le domaine transmembranaire de NEXT est ensuite clivé par le complexe γ -sécrétase au site S3/S4 ce qui libère NICD dans le cytoplasme et le peptide N β dans l'espace intercellulaire. La localisation subcellulaire du clivage par le complexe γ -sécrétase n'est pas claire et pourrait en partie au moins en partie avoir lieu dans des

endosomes. Le complexe γ -sécrétase est composé de 4 protéines membranaires ((Li, Li et al. 2008) (Sato, Diehl et al. 2007) : la présinilín qui a l'activité catalytique, et 3 cofacteurs, NCT (Nicastrin), Pen2 et Aph1. Les mammifères possèdent plusieurs isoformes de ces protéines, ce qui permet de former différents complexes γ -sécrétase dont la fonction n'a pas été explorée. NICD est transféré dans le noyau, où il interagit avec une protéine CSL (CBF1/RBP_{jk}/Su(H)/Lag-1) et recrute le coactivateur Mastermind/Lag-3 ainsi qu'un complexe médiateur d'activation de la transcription (Kopan and Ilagan 2009).



Source : (Gordon, Vardar-Ulu et al. 2007)

Figure 4 : Structure et conformation de la région NRR (région de régulation négative) de la protéine NOTCH2 humaine

Les trois domaines LNR sont colorés par différents tons de roses, le domaine d'hétérodimérisation (HD) est en blanc et vert, les ponts disulfure sont en rouge et la position des sites de clivage S1 et S2 est indiquée par les flèches rouges.

Le panneau inférieur présente le modèle de mécanotransduction dans lequel l'internalisation des ligands crée une force mécanique qui démasque le site S2. Les domaines LNR protègent le site S2 qui est dans le domaine HD. La traction générée par l'internalisation des ligands éloigne les LNR du domaine HD et permet aux protéases ADAM de cliver et d'activer Notch.

1.5 Les différents niveaux de régulation de l'activation du récepteur Notch

Notch intègre à la fois une activité de récepteur à la surface de la cellule et une activité de régulateur transcriptionnelle dans le noyau. Ces deux fonctions sont permises par une protéolyse intramembranaire régulée (RIP). Ce mode de signalisation n'est pas courant et concerne aussi des protéines comme APP ou N-Cadherin (Brown, Ye et al. 2000). Il a la particularité d'être irréversible, chaque molécule de Notch ne signalant qu'une fois et ne pouvant être recyclée. La signalisation est aussi directe et n'est pas relayée par des seconds messagers; ce qui limite les possibilités d'amplification du signal et d'interaction avec d'autres voies de signalisation. Si l'activation de Notch est irréversible et pas amplifiable, elle est néanmoins très précisément contrôlée dans le temps, dans l'espace, dans son niveau et sa durée.

1.5.1 Régulation du patron d'expression des ligands de Notch

Si l'expression de Notch est assez homogène et ubiquitaire chez la drosophile, les ligands ont des patrons d'expression qui peuvent être distincts. Ces patrons d'expression sont dynamiques et sont rétrocontrôlés positivement ou négativement par la signalisation Notch, mais aussi par d'autres voies de signalisation comme FGF, PDGF, TGF β , VEGF, Hedgehog et Wnt (Wu and Bresnick 2007). Cette régulation de l'expression des ligands par d'autres voies de signalisation permet l'intégration de la signalisation Notch dans un réseau moléculaire complexe.

Les patrons d'expression des ligands ne correspondent pas au patron d'activation du récepteur qui est plus restreint. Cela suggère donc des mécanismes de restriction de l'activité de Notch.

1.5.2 Effet *cis*-inhibiteur des ligands sur l'activité de Notch

En plus de leur rôle activateur en *trans*, c'est-à-dire sur l'activité de Notch dans la cellule adjacente, les ligands peuvent aussi inhiber l'activité de Notch en *cis*, par des interactions avec le récepteur au sein de la même cellule (Fiuza and Arias 2007) (Klein, Brennan et al. 1997) (Micchelli, Rulifson et al. 1997) (Jacobsen, Brennan et al. 1998 {Klein, 1998 #208) (Sakamoto, Ohara et al. 2002), (Ladi, Nichols et al. 2005) (Glittenberg, Pitsouli et al. 2006). Si beaucoup d'études sont basées sur les phénotypes de surexpression des ligands, la *cis*-inhibition a aussi été montrée en perte de fonction chez la drosophile, ce qui suggère une fonction endogène d'inhibition (Micchelli, Rulifson et al. 1997) (Miller, Lyons et al. 2009). Chez les vertébrés, la surexpression de la partie extracellulaire des ligands bloque aussi de façon autonome cellulaire la signalisation Notch (Dorsky, Chang et al. 1997) (Henrique, Hirsinger et al. 1997) (Franklin, Berechid et al. 1999) (Lowell, Jones et al. 2000) (Lowell and Watt 2001). Le mécanisme sous-jacent la *cis*-inhibition n'est pas connu, mais l'interaction ligand/récepteur en *cis* pourrait entrer en compétition avec l'interaction en *trans*.

1.5.3 Régulation de l'interaction ligand-récepteur par glycosylation du récepteur

Notch est une protéine glycosylée. En effet, plusieurs de ses répétitions EGF peuvent être modifiées par O-fucosylation et O-glucosylation (Haines and Irvine 2003) (Rampal, Luther et al. 2007) (Stanley 2007) (Vodovar and Schweisguth 2008).

Après sa traduction, Notch est d'abord fucosylé sur certaines répétitions EGF par O-fut1, qui a aussi une activité chaperonne indépendante de son activité de fucosylation. Cet O-fucosylation est un prérequis pour l'addition successive de glucose sur le fucose par Fringe. La glycosylation de Notch par Fringe dans son domaine d'interaction avec les ligands module son affinité pour tel ou tel ligand. Ainsi, l'addition par Fringe d'un résidu GluNAc (N-acetyl glucosamine) sur l'EGFR 12 de Notch chez la drosophile est suffisante pour augmenter son affinité pour Delta et diminuer son affinité pour Serrate (Xu, Haines et al. 2007). Chez les mammifères, le rôle de la glycosylation de Notch est moins clair car compliqué par la présence de plusieurs récepteurs, et de plusieurs protéines Fringe (Lfng, Lunatic Fringe ; Mfng, Manic Fringe ; and Rfng, Radical Fringe). Notch est aussi O-glucosylé par RUMI

(Acar, Jafar-Nejad et al. 2008). La perte de l'activité RUMI perturbe largement l'activation de Notch dans de nombreux contextes et de façon température sensible, sans qu'on sache si c'est la conformation du récepteur qui est modifiée, sa stabilité, sa maturation ou son activation.

1.5.4 Régulation de l'activité des ligands par protéolyse

Les ligands transmembranaires sont aussi des cibles des métalloprotéases ADAM, et du complexe γ -sécrétase (D'Souza, Miyamoto et al. 2008), mais la fonction de ces clivages dans la régulation de la signalisation n'est pas claire. Il y a cinq métalloprotéases ADAM chez la drosophile : Kuzbanian (Kuz) et Kuzbanian-like (Kul), homologues de ADAM10, Meltrin et Mmd, homologues de ADAM12, et TACE, homologue de ADAM17. Kuz et TACE permettent le clivage de Notch en S2 mais elles sont aussi impliquées dans le clivage de DI en cellule en culture ainsi qu'*in vivo* {Mishra-Gorur, 2002 #301} (Qi, Rand et al. 1999) (Lieber, Kidd et al. 2002) (Delwig and Rand 2008). La fonction de Kul en revanche se restreint au clivage de DI. Kul contrôle le niveau de DI et joue ainsi sur son activité cis-inhibitrice et son activité trans-activatrice.

Les études qui supportent l'idée que la partie intracellulaire des ligands est transférée dans le noyau et participe à l'activation de la transcription de gènes cibles, sont basées sur des expériences de surexpression de fragments construits et ne correspondent pas à un clivage physiologique des ligands. Aucune preuve ne supporte pour l'instant l'hypothèse d'une activité signalisatrice du domaine intracellulaire issu du clivage des ligands.

1.5.5 Importance de l'endocytose dans la régulation de la signalisation Notch

Le(s) récepteur(s) Notch et certain de ses ligands étant des protéines transmembranaires (Figure 3), la régulation de leurs activités signalisatrices par le trafic membranaire est aussi primordial.

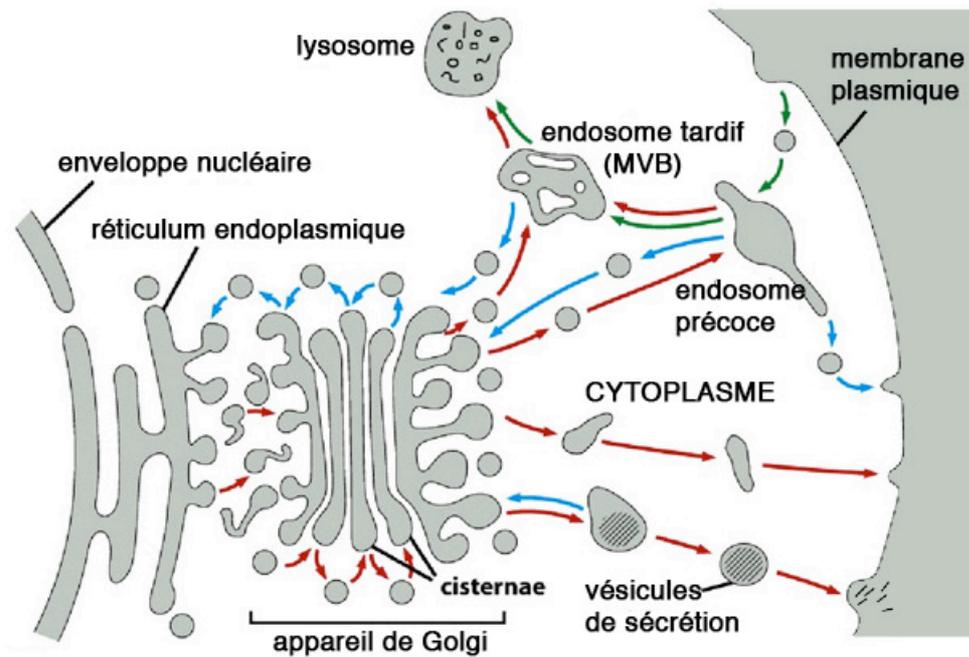
Cet aspect est au cœur de la problématique de ma thèse et fait plus particulièrement l'objet de la seconde partie de l'introduction.

2 Importance du trafic membranaire dans la signalisation Notch, et rôle de l'ubiquitination et de l'endocytose des ligands dans l'activation du récepteur Notch

Après avoir donné des notions générales sur l'endocytose et l'ubiquitination ainsi que sur les interconnexions entre endocytose et signalisation cellulaire en général, je me focalise sur le rôle de l'endocytose dans la régulation de la signalisation Notch et plus précisément sur le rôle de l'ubiquitination et de l'endocytose des ligands dans l'activation du récepteur Notch.

2.1 L'endocytose en quelques étapes fondamentales

Le trafic membranaire, représenté schématiquement dans la figure 5, permet des échanges entre les différents compartiments de la cellule par l'intermédiaire de vésicules. L'endocytose permet d'internaliser un morceau de la membrane plasmique et les molécules qui lui sont associées à l'intérieur de la cellule. On peut découper ce processus en un certain nombre d'étapes fondamentales qui comprennent l'identification et le tri des cargos, la formation de la vésicule par invagination de la membrane plasmique, son détachement et son adressage à un compartiment cible. Chacune de ces étapes de base nécessite l'action concertée d'un réseau de protéines et de lipides.



Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figure 5 : Représentation schématique du trafic membranaire d'une cellule

Tous les compartiments membranaires de la cellule communiquent entre eux, directement ou indirectement, par le transport de vésicules. La voie de biosynthèse et de sécrétion est représentée par les flèches rouges. Elle permet le transport de molécules du réticulum endoplasmique aux différents compartiments membranaires et à la membrane plasmique. La voie d'endocytose représentée par des flèches vertes, permet l'internalisation de molécules dans des vésicules à partir de la membrane plasmique et leur adressage aux endosomes précoces, puis éventuellement aux endosomes tardifs et aux lysosomes. Les cargos internalisés peuvent aussi être recyclés à la membrane plasmique ou être adressés à l'appareil de Golgi et/ou au réticulum endoplasmique (indiqué par les flèches bleues).

2.1.1 Identification du cargo par la machinerie d'endocytose

Différents motifs intrinsèques au cargo et basés sur des tyrosines (Bonifacino, Marks et al. 1996) ou des motifs dileucines (Letourneur and Klausner 1992) ont été identifiés comme étant nécessaires à l'internalisation de différents cargos (Traub 2009). Ils sont reconnus par le complexe adaptateur AP-2 qui est composé de différents modules d'interaction et fait la connexion entre les cargos, les lipides de la membrane comme le phosphoinositide PI(4,5)P2 et la machinerie d'endocytose par l'intermédiaire de la clathrine (Collawn, Stangel et al. 1990 {Schmid, 2007 #119}).

Des petites protéines comme l'ubiquitine peuvent aussi être utilisées pour marquer de façon covalente et réversible un cargo qui sera ensuite reconnu par des adaptateurs à domaine UBD (ubiquitin binding domain) comme l'epsin. Le rôle des

ubiquitine ligases et de l'ubiquitination dans l'internalisation et l'adressage des cargos est détaillé dans la partie 2.1.3. de ce paragraphe.

Selon le signal d'internalisation, différentes protéines adaptatrices sont probablement impliquées et mettent en place des plateformes d'interaction différentes qui recrutent les différents acteurs autour du site d'internalisation.

2.1.2 -Invagination de la membrane, formation et détachement de la vésicule

Une fois les cargos identifiés et regroupés au site d'internalisation, la cellule doit déformer sa membrane plasmique pour former une vésicule de volume restreint. Cette déformation nécessite des réarrangements lipidiques, une asymétrie entre la face externe et la face interne de la membrane en termes de densité de lipides et/ou de type de lipides. Cette asymétrie se fait aussi grâce à l'insertion, dans la couche interne de la membrane, des hélices amphipathiques de protéines à domaine BAR qui modulent la courbure de la membrane.

Les manteaux de clathrine, de caveoline ou de flotillin, sont aussi impliqués dans la formation de la vésicule et ont donné leur nom à différentes « voies d'endocytose ». L'assemblage de la clathrine forme un échafaudage hexagonal qui structure la vésicule. Les protéines adaptatrices forment une seconde couche entre le manteau de clathrine et la membrane. Leur affinité avec les cargos et les lipides leur permet de déformer la membrane et de séquestrer les cargos dans la vésicule en formation. La caveoline quant à elle a une structure en épingle à cheveux enchâssée dans la membrane. Elle est palmitoylée et interagit avec le cholestérol et les chaînes d'acide gras des glycosphingolipides (GSLs) (Harder and Simons 1997), ce qui stabilise la formation d'oligomères appelées cavéoles (Dietzen, Hastings et al. 1995) (Kurzchalia and Parton 1996). La flotillin est aussi une protéine qui s'oligomérisse dans des domaines membranaires distincts des cavéoles ou des puits recouverts de clathrine (Frick, Bright et al. 2007). Son homologie avec la caveoline suggère qu'elle joue un rôle dans l'organisation des lipides. Chez la drosophile, la caveoline n'a pas d'orthologue, mais Reggie-1/flotillin-2, qui ont été impliqués dans la sécrétion et la portée des gradients de Wingless et Hedgehog sont des orthologues de la flotillin (Katanaev, Solis et al. 2008) (Langhorst, Reuter et al. 2008).

Chez la levure, le cytosquelette d'actine est aussi impliqué dans l'internalisation de la membrane. En effet, le manteau de clathrine recrute des régulateurs de la polymérisation et de la nucléation du réseau cortical d'actine comme le complexe Arp2/3 et son régulateur WASP (Vartiainen and Machesky 2004). Le réseau d'actine ainsi mis en place au site d'internalisation sert de rails aux myosines pour internaliser la vésicule en formation (Kaksonen, Toret et al. 2005) (Sun, Kaksonen et al. 2005). Si le rôle du cytosquelette d'actine dans l'internalisation des vésicules est bien établi chez la levure, il est moins clair chez les mammifères et la drosophile.

Une fois la vésicule formée, elle doit se détacher de sa membrane d'origine. La dynamine est une grande GTPase qui induit la tubulation de liposomes et leur pincement en formant un oligomère en spirale qui rapproche les deux parties du cou de la vésicule et permet leur fusion (Doherty and McMahon 2009). Elle est impliquée aussi bien dans l'internalisation dépendant de la clathrine que celle dépendant de la caveoline.

Ces différentes étapes de formation de la vésicule et de scission sont bien sûr interconnectées grâce à des protéines interagissant avec plusieurs acteurs à la fois.

2.1.3 -Reconnaissance et fusion au compartiment cible

Une fois détachée de la membrane, la vésicule peut se déplacer le long des filaments d'actine et de microtubules et fusionner avec des endosomes. La surface des différents endosomes exhibe des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement certains marqueurs présents sur les vésicules internalisées et qui les identifient en fonction de leur origine et du type de cargo qu'elle transporte. Ce processus crucial dépend en particulier de deux types de protéines, les petites GTPase de la famille des Rab et les SNARE.

La famille des Rab est impliquée dans les quatre étapes majeures du trafic membranaire : le bourgeonnement de la vésicule, son adressage, son ancrage et la fusion de sa membrane avec le compartiment ciblé. Ces différentes fonctions se font à travers l'activation de différents effecteurs et l'interaction avec les effecteurs est contrôlée par les GEF (Figure 6). Ces combinaisons GEF/ Rab/ effecteurs définissent des domaines membranaire spécifiques et confèrent au trafic membranaire sa

spécificité. Il existe 33 protéines Rab chez la drosophile, et leur fonction respective n'est pas toujours caractérisée. Rab5 par exemple est spécifiquement localisé à la membrane des endosomes précoces. Elle active une phosphatidylinositol 3-kinase qui convertit localement le phosphatidylinositol (PI) en phosphatidylinositol(3)-phosphate (PI(3)P), qui recrute à son tour des protéines d'ancrages spécifiques qui vont permettre la capture de vésicules recouvertes de clathrine provenant de la membrane plasmique (Figure 6B). Une fois qu'une vésicule est ancrée à sa membrane cible, le rapprochement des membranes se fait grâce à des protéines de fusion spécialisées, les protéines SNARE. Il y a deux types de SNARE, les v-SNARE, associées à la membrane des vésicules, et les t-SNARE, associés aux membranes des compartiments cibles. Leurs domaines en hélice α typiques leur permettent de former un complexe en *trans* qui rapproche et fusionne les membranes.

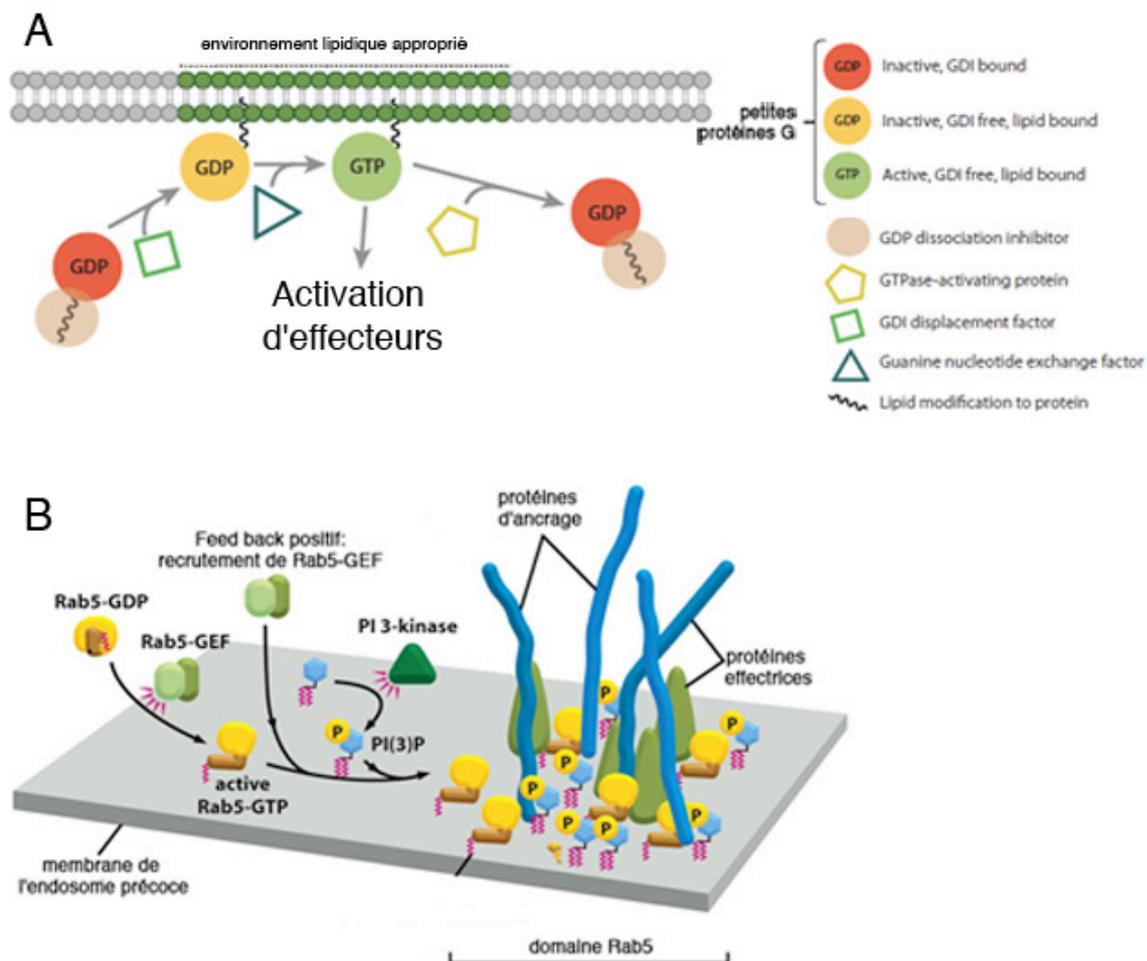


Figure 6 : Cycle d'activité des Rab et formation d'un domaine Rab5

Les Rab font parti des GTPase de la super famille des Ras. Ces protéines oscillent entre deux formes, une forme active membranaire liée au GTP (source d'énergie) et une forme inactive cytosolique liée au GDP.

A : Cycle d'activité des Rab

La forme inactive de Rab interagit avec un GDI (GTPase Dissociation Inhibitors schématisé par un cercle brun) qui masque son ancre isoprenyle (schématisé par une queue en zigzag) et maintient une forme inactive soluble dans le cytoplasme. L'attachement à la membrane nécessite l'activité d'une GDF (GTPase Displacement Factor, schématisé par un carré) qui dissocie le complexe GTPase/ GDI et libère le site d'ancrage à la membrane. La GTPase peut ensuite être activée par des GEFs (Guanine nucleotide exchange factor, schématisé par un triangle) et activer à son tour des effecteurs. Elle peut ensuite être inactivée par des GAP (GTPase-activating Protein, schématisé par un hexagone) qui accélère l'hydrolyse du GTP en GDP.

B : Formation d'un domaine Rab5 sur la membrane d'un endosome précoce

La forme active de Rab5 permet l'activation de différents effecteurs dont une phosphatidylinositol 3-kinase qui phosphoryle localement les phosphatidylinositols (PI) en phosphoinositides (PI(3)P). Rab5 et PI(3)P recrute de nombreux effecteurs comme des protéines d'ancrage qui attrapent les vésicules recouvertes de clathrine en provenance de la membrane. Rab5 activé recrute aussi plus de GEF ce qui crée un rétrocontrôle positif et amplifie l'assemblage du domaine Rab5 à la membrane de l'endosome.

2.1.4 Notions d'interconnection, de robustesse et de redondance des « voies d'internalisation »

À l'échelle d'une cellule, on peut identifier différentes « voies » d'internalisation canoniques » selon leur dépendance vis-à-vis de certaines protéines, leur sensibilité à certaines drogues, leur capacité à internaliser des cargos spécifiques et leur caractéristique morphologique. On trouve ainsi dans la littérature la voie clathrine, la voie caveoline, la voie CLIC/GEEC (clathrine independant carrier/ GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment), la voie IL2R β , la voie Arf6, la voie flotillin, etc... Ces différentes voies d'internalisation ne correspondent toutefois pas à des successions linéaires d'étapes, mais à différentes combinaisons d'étapes fonctionnelles. Un cargo peut emprunter différents chemins et utiliser différents réseaux pour aller de la membrane à l'endosome précoce par exemple, ces différents réseaux étant interconnectés et partageant certains acteurs.

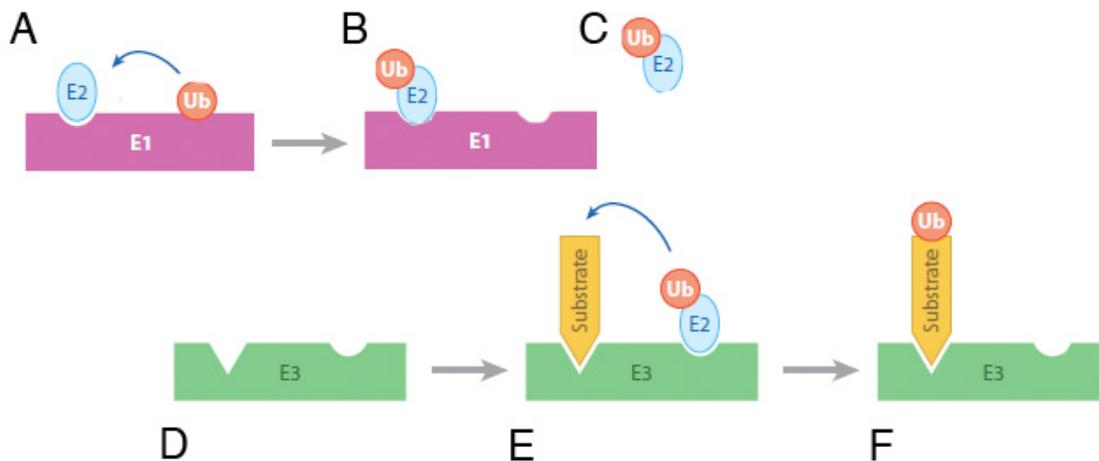
L'interconnections entre les différents réseaux de protéines, entre les différents chemins d'internalisation et la redondance fonctionnelle de certains acteurs rendent le système robuste et flexible.

2.2 L'ubiquitination comme signal d'internalisation

Les eucaryotes utilisent des polypeptides comme l'ubiquitine pour marquer certaines protéines de façon covalente et réversible (Hershko and Ciechanover 1992), (Hershko and Ciechanover 1986). Nous allons voir dans ce paragraphe le mécanisme d'ubiquitination par les ubiquitine ligases E3 domaine RING, et le rôle de cette modification post-traductionnelle dans le trafic membranaire de la cible ubiquitinée.

2.2.1 Mécanisme d'ubiquitination par les ubiquitine ligases E3 à domaine RING :

L'ubiquitine est un polypeptide très conservé de 8kDa qui peut être lié de façon covalente sur une lysine (Lys) de la protéine substrat. L'ubiquitination d'une protéine est obtenue grâce à la collaboration entre trois enzymes : une enzyme activatrice d'ubiquitine ou E1, une enzyme de conjugaison ou E2, et une ubiquitine ligase ou E3 (Figure 7). Il existe différentes catégories d'E3 et je ne présente ici que les E3 à domaine RING (Really Interesting New Gene). Elles ont la particularité d'interagir à la fois avec le substrat et avec l'E2 chargée d'une ubiquitine (E2-Ub). Le domaine RING qui correspond à un octet de cystéines et d'histidines interagit physiquement avec l'E2 et catalyse le transfert d'ubiquitines de l'E2 au substrat. En amont l'E1 catalyse l'addition de l'ubiquitine sur l'E2 qui sert de support intermédiaire.



Adapté de (Deshaies and Joazeiro 2009)

Figure 7 : Ubiquitiation d'un substrat nécessite la collaboration de trois enzymes, une enzyme dite activatrice, l'E1, une enzyme de conjugaison, l'E2 et une ubiquitine ligase, E3

A-B : L'enzyme activatrice d'ubiquitine E1 (en violet) catalyse le transfert d'ubiquitine (en rouge) sur l'enzyme de conjugaison E2 (en bleu),

C : L'E2 chargée d'ubiquitine est libérée

D-E-F : L'ubiquitine ligase E3 (en vert) interagit à la fois avec le substrat (en jaune) et l'enzyme de conjugaison E2 chargée d'une ubiquitine. Elle catalyse le transfert de l'ubiquitine de l'E2 au substrat.

Il existe différents modes d'ubiquitination. La monoubiquitination est l'addition d'une seule ubiquitine sur la lysine (K) d'un substrat. La multiubiquitination correspond à la monoubiquitination de plusieurs lysines du substrat, et la polyubiquitination est la modification d'un substrat sur une lysine avec une chaîne d'ubiquitines. En effet, chaque ubiquitine possède 7 lysines internes (en positions 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63) qui peuvent tous être à leur tour ubiquitaires. Il existe donc de nombreuses topologies possibles pour les chaînes d'ubiquitines. Les chaînes basées sur les K48 et K63 sont les mieux caractérisées et sont probablement les plus courantes. Le mécanisme qui dirige la mise en place de ces différentes topologies n'est pas encore connu.

Les E3 sont à la base de la spécificité du processus d'ubiquitination en sélectionnant le substrat à ubiquitiner. Elles catalysent différentes réactions : initiation de la chaîne d'ubiquitine sur le substrat, élongation de cette chaîne, enfin elles contrôlent aussi potentiellement la topologie de la chaîne d'ubiquitine. Chacune de ces réactions peuvent être régulées et nos connaissances des partenaires et des mécanismes

d'action de ces E3 restent rudimentaires (Deshaies and Joazeiro 2009). On sait que l'ubiquitination est souvent régulée par le statut de phosphorylation du substrat, la phosphorylation augmentant par exemple l'affinité de l'E3 pour son substrat. La phosphorylation peut aussi réguler directement, positivement ou négativement, l'activité de l'E2 ou de l'E3. L'activité des E3 peut aussi être régulée par conjugaison avec des ubiquitines ou des protéines ubiquitines-like. En effet, beaucoup d'E3 sont ubiquitinées par un processus autocatalytique, ou par une autre E3 ce qui peut cibler l'E3 vers le protéasome par exemple. Les E3 peuvent aussi être régulées par des partenaires d'interaction, des inhibiteurs comme des pseudosubstrats, ou encore des petites molécules qui peuvent jouer le rôle de régulateurs allostériques, ou de co-substrat. Enfin, les E3 peuvent être régulées par la compétition entre leurs différents substrats.

2.2.2 Fonction de l'ubiquitination dans le trafic membranaire :

Les fonctions de l'ubiquitination sont multiples. L'assemblage d'une chaîne d'au moins quatre ubiquitines liées entre elles par leur Lys48 est un signal d'adressage de la protéine cible à la dégradation par le protéasome (Hershko and Ciechanover 1992) (Chau, Tobias et al. 1989) (Thrower, Hoffman et al. 2000). En revanche la monoubiquitination, la multiubiquitination ou la polyubiquitination avec des chaînes d'ubiquitines liées par la Lys63 correspondent à des signaux d'internalisation et/ou l'adressage endosomal de cargos transmembranaires (Deshaies and Joazeiro 2009). Les fonctions de ces différentes topologies de chaînes d'ubiquitines sont encore mal connues.

La monoubiquitination d'une protéine transmembranaire peut être un signal d'internalisation suffisant (Terrell, Shih et al. 1998). En effet chez la levure par exemple, le remplacement de la partie intracellulaire du récepteur du facteur- α par une ubiquitine en phase, qui ne peut pas être elle-même ubiquitinée, est suffisant pour son internalisation. Les domaines protéiques d'interaction à l'ubiquitine (UBD pour ubiquitin-binding domaine) ont une affinité relativement faible pour la monoubiquitine (Hicke, Schubert et al. 2005), mais la plupart des protéines à domaines UBD ont plusieurs UBD qui peuvent avoir un effet coopératif, et pourraient induire le regroupement et la multimérisation du cargo. Elles possèdent souvent

d'autres modules fonctionnels qui reconnaissent des phospholipides spécifiques ou d'autres protéines accessoires qui peuvent avoir un effet coopératif. L'epsin par exemple possède trois UBD, un domaine qui reconnaît les phosphoinositides (Itoh, Koshiba et al. 2001) et un domaine d'interaction avec la clathrine, l'interaction avec ces trois composants créant un site spécifique d'internalisation. La polyubiquitination avec une topologie de chaînes K63 peut aussi faciliter l'endocytose du cargo et permet une internalisation plus efficace que la monoubiquitination (Galan and Haguenauer-Tsapis 1997). Les chaînes d'ubiquitine pourraient interagir avec différents UBD, et permettre aux récepteurs qui ont un petit nombre de Lys intracellulaire et qui ne peuvent pas être multiubiquitinés d'être efficacement internalisés.

Si l'ubiquitination est un signal d'internalisation à la membrane plasmique, c'est aussi un signal d'internalisation dans les vésicules lumineales des MVBs (Chen and Davis 2002).

2.3 Importance du trafic membranaire dans la régulation de la signalisation cellulaire en général et plus particulièrement pour la signalisation Notch

2.3.1 Trafic membranaire et signalisation cellulaire en général

À travers le processus d'endocytose, la cellule peut contrôler la quantité de récepteurs activables à sa surface en les internalisant et les stockant de façon transitoire dans les endosomes. Ils peuvent ensuite être recyclés à la membrane plasmique ou dégradés dans les lysosomes. L'adressage aux lysosomes atténuera la capacité de la cellule à répondre au signal, alors que le recyclage à la membrane après dissociation du ligand restaurera sa capacité à répondre au signal. L'endocytose permet aussi de concentrer spécifiquement différents régulateurs de la signalisation cellulaire au niveau de la membrane des endosomes. Ces associations membranaires d'acteurs de la signalisation cellulaire constituent alors ce qu'on appelle des plateformes signalisatrices et permettent par exemple de moduler l'intensité et la durée du signal. Si l'endocytose contrôle les processus de

signalisation cellulaire, la réciproque est aussi possible. La machinerie d'endocytose peut être régulée par des événements de signalisation, ce qui donne une idée du degré d'interconnection fonctionnelle qui existe entre les mécanismes de signalisation et d'endocytose.

2.3.2 Trafic membranaire et signalisation Notch

Une des premières indications du rôle de l'endocytose dans la signalisation Notch vient de l'analyse d'une mutation thermosensible appelée *shibire*^{ts}, qui a ensuite été identifiée comme étant un allèle de la dynamine, impliquée dans le pincement et le détachement des vésicules d'endocytose {Chen, 1991 #305} (van der Bliek and Meyerowitz 1991). Les embryons mutants présentent à la température restrictive un phénotype neurogénique avec une hypertrophie du système nerveux par rapport à l'épiderme ventral caractéristique d'une perte de fonction Notch (Poodry 1990). L'importance de l'endocytose du récepteur Notch et de ses ligands transmembranaires, dans la régulation de la signalisation Notch, a depuis été largement confirmée :

-Dans la cellule réceptrice du signal, la dynamine (*shibire*, *shi*) (Seugnet, Simpson et al. 1997), Rab5 et la syntaxin Avalanche (*avl*) (Lu and Bilder 2005), toutes impliquées dans la formation d'endosomes précoces, sont nécessaires à l'activation du récepteur Notch. La localisation subcellulaire du clivage de Notch par la γ -sécrétase n'a pas été clairement établie, et une partie au moins du clivage de NEXT par la γ -sécrétase pourrait se faire dans un compartiment intracellulaire. Enfin, différentes données suggèrent que l'accumulation de Notch dans un endosome tardif entraîne son activation potentiellement à cause d'un changement de conformation dû à la diminution du pH (Vaccari, Lu et al. 2008), (Childress, Acar et al. 2006), (Gallagher and Knoblich 2006), (Jaekel and Klein 2006).

-L'endocytose des ligands de Notch dans la cellule signalisatrice est aussi paradoxalement indispensable pour l'activation du récepteur Notch dans la cellule réceptrice. Tout d'abord, l'analyse clonale du mutant *shibire* chez la drosophile a montrée que la dynamine était nécessaire aussi bien dans la cellule réceptrice que dans la cellule signalisatrice (Seugnet, Simpson et al. 1997). Ensuite, les ligands DI

et Ser sont à la fois localisés à la membrane apicale des cellules et dans des vésicules d'endocytose (Kooch, Fehon et al. 1993) (Parks, Turner et al. 1995), et des mutants de Delta qui ne sont pas ou moins internalisés, ont une activité signalisatrice réduite. Enfin, des cribles génétiques chez la drosophile et le poisson zèbre, ont permis d'identifier différentes protéines associées aux processus d'endocytose et indispensables à l'activité signalisatrice des ligands (Le Borgne, Bardin et al. 2005). C'est le cas par exemple de la clathrine, de l'auxilin qui régulent la dynamique du manteau de clathrine (Eun, Lea et al. 2007), de l'Epsin/liquid facet (lqf) (Overstreet, Fitch et al. 2004) (Tian, Hansen et al. 2004) (Wang and Struhl 2004), et des deux ubiquitines ligases à domaine RING, Neuralized (Neur) (Deblandre, Lai et al. 2001) (Lai, Deblandre et al. 2001) (Pavlopoulos, Pitsouli et al. 2001) (Yeh, Dermer et al. 2001; Le Borgne and Schweisguth 2003) et Mindbomb (Mib) (Itoh, Kim et al. 2003) (Bingham, Chaudhari et al. 2003) (Lai, Roegiers et al. 2005) (Chen and Casey Corliss 2004).

2.4 Rôles des ubiquitine ligases Neuralized et Mind bomb dans l'activité signalisatrice des ligands

Neur et Mib sont deux ubiquitine ligases E3 conservées de la mouche aux vertébrés, dont la structure diffère complètement (Figure 8), et dont la perte de fonction entraîne des phénotypes associés à des pertes de la signalisation Notch.

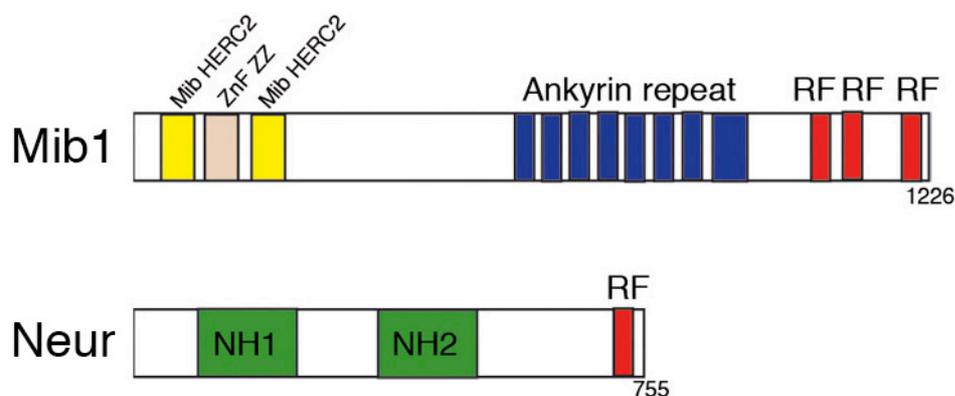


Figure 8 : Mib1 et Neur sont deux ubiquitine ligases E3 différentes de la famille des Ring Finger

Ces schémas représentent les structures de Mib1 et Neur chez la drosophile.

Mib1 a dans sa partie N-terminale un domaine en doigt de zinc (ZnfZZ) flanqué de part et d'autre par des domaines Mib/HERC2, suivie de répétition ankyrin, puis de deux domaines RING finger (RF, RING for Really Interesting New Gene) atypiques, et d'un domaine RING à l'extrémité C-terminale qui est associé à l'activité catalytique de l'ubiquitine ligase.

Neur est une protéine de 754 acides aminés qui est composée de deux domaines conservés NH1 et 2 (Neur homology repeat) dont la fonction n'est pas connue et d'un domaine RING finger (RF, RING for Really Interesting New Gene) associé à l'activité catalytique ubiquitine ligase, à l'extrémité C-terminale de la protéine.

2.4.1 Neuralized et Mind bomb sont nécessaires à des processus développementaux distincts, dépendant de la signalisation Notch

Chez la drosophile, une absence de *neur* dans les cellules du notum bloque l'activation de DI et entraîne un défaut d'inhibition latérale et la spécification de SOP en excès. Lors de la division asymétrique, DI inactif dans la cellule fille antérieure n'activera pas Notch dans la cellule fille postérieure. On obtient ainsi deux pIIb qui vont chacune se diviser et donner deux neurones. Un clone mutant *neur* dans le notum a donc une cuticule nue, sans organes extérieurs (Figure 9, B), et chaque SOP produit 4 neurones. L'absence de *neur* lors du développement de l'aile n'a pas de conséquence sur la spécification des cellules de la marge (Figure 9 F).

Une absence de *mib1* dans le notum, *neur* étant présent, entraîne un défaut d'inhibition latérale avec une légère augmentation de la densité des soies sensorielles, sans perturber les destins cellulaires lors de la division asymétrique. Par contre, l'absence de *mib1* empêche l'activation de Notch à la frontière dorso-ventrale et la spécification des cellules de la marge de l'aile, ce qui bloque la croissance (Figure 9 E,G). Neur et Mib1 sont donc requis pour des événements distincts dépendant de Notch, Neur pour l'inhibition latérale et la division asymétrique dans le notum et Mib1 pour l'induction de la marge de l'aile.

Il a été montré par aussi bien par des analyses génétiques que des transplantations, que Neur et Mib agissent de façon non autonome cellulaire. Neur et Mib sont requis dans la cellule signalisatrice pour activer Notch dans la cellule réceptrice (Itoh, Kim et al. 2003) (Le Borgne and Schweisguth 2003; Le Borgne and Schweisguth 2003) (Bingham Chitnis 2003) (Pavlopoulos, Pitsouli et al. 2001) (Li and Baker 2004).

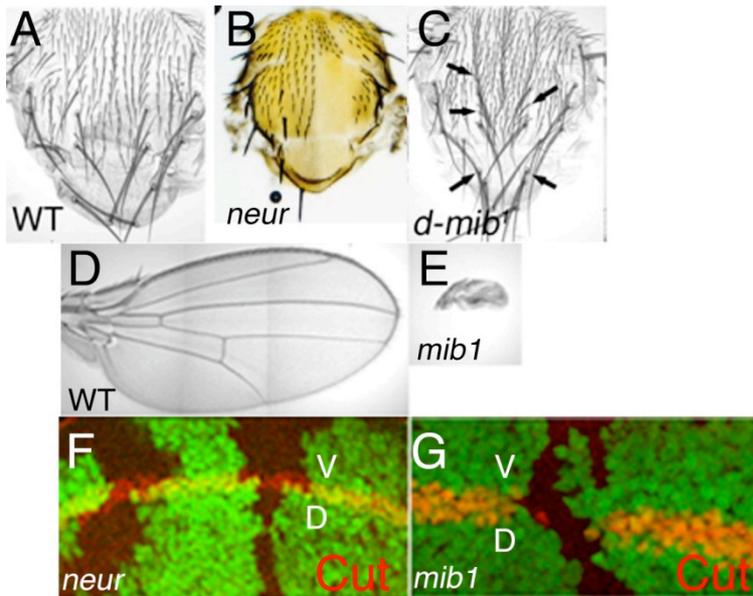


Figure 9 : *mib1* et *neur* joue des rôles distincts dans le développement de la drosophile

A : Un notum sauvage présente un espacement régulier des organes sensoriels

B : Une absence de *neur* en clone dans le notum produit un phénotype de cuticule nue. Ce phénotype est du à un défaut d'activation de DI pendant l'inhibition latérale et la division asymétrique qui induit la différenciation de SOP en excès, chaque SOP produisant 4 neurones.

C : Une absence de *mib1* entraîne un défaut d'inhibition latérale avec une légère augmentation de la densité des SOP (flèches), sans perturber les destins cellulaires lors de la division asymétrique.

D : Aile sauvage

F : Dans le disque d'aile, l'absence de *neur* en clone (marqué par l'absence de GFP) n'a pas de conséquence sur la spécification des cellules de marges marquées par Cut (en rouge)

E, G : L'absence de *mib1* en revanche empêche l'activation de Notch à la frontière Dorso-Ventrale (D/V) et interrompt l'expression de Cut (en rouge dans G, le clone *mib1* étant marqué par l'absence de GFP). La marge de l'aile n'est pas spécifiée et il n'y a pas de croissance (E)

2.4.2 Neuralized et Mind bomb ont des activités moléculaires redondantes mais pas strictement identiques

Neur coimmunoprécipite avec DI, l'ubiquitine, induit son internalisation *in vivo* et régule positivement son activité signalisatrice chez la drosophile et le xénope (Deblandre, Lai et al. 2001) (Lai, Deblandre et al. 2001) (Pavlopoulos, Pitsouli et al. 2001) (Le Borgne and Schweisguth 2003) (Yeh, Dermer et al. 2001). DI est internalisé via Neur même en l'absence de Notch dans l'embryon de drosophile, ce qui suggère que l'interaction avec le récepteur n'est pas requise pour l'internalisation de DI (Morel, Le Borgne et al. 2003).

Mib quant à elle coimmunoprécipite avec DI et Ser, les ubiquitine, induit leur endocytose *in vivo*, et régule positivement leur activité signalisatrice chez la drosophile (Le Borgne, Remaud et al. 2005) (Lai, Roegiers et al. 2005), alors que

chez le poisson zèbre Mib ne s'associe physiquement et ne régule que l'endocytose de DI (Chen and Casey Corliss 2004) (Itoh, Kim et al. 2003).

On ne sait pas selon quel mode Neur et Mib ubiquitine les ligands de Notch. Mais chez la drosophile, il semble que la monoubiquitination de DI soit suffisante à son internalisation et à son activité signalisatrice. En effet, la surexpression d'une construction de DI dans laquelle la partie intracellulaire de la protéine est remplacée par une monoubiquitine en phase est capable d'activer un rapporteur de la signalisation Notch (Wang and Struhl 2004), alors que ce n'est pas le cas de la version de DI sans domaine intracellulaire (Sun and Artavanis-Tsakonas 1996), ou de la version dans laquelle le domaine intracellulaire est remplacé par une ubiquitine mutée (Shih, Katzmann et al. 2002) (Wang and Struhl 2004).

In vivo chez la drosophile, Neur et Mib1 sont en partie interchangeables. L'expression ectopique de *neur* sauve le phénotype de marge induit par l'absence de *mib1* dans l'aile (Le Borgne, Remaud et al. 2005), et réciproquement la surexpression de *mib1* dans les SOP sauve le phénotype neurogénique de *neur* dans le notum (Lai, Roegiers et al. 2005). Cette interchangeabilité de Neur et Mib1 suggère des activités moléculaires redondantes, et la différence de fonction des ubiquitine ligases peut alors s'expliquer par la différence de patron d'expression. En effet, si l'expression de *mib1* semble ubiquitaire, celle de *neur* est restreinte aux SOP (Boulianne, de la Concha et al. 1991).

Cette interchangeabilité n'est toutefois pas totale. L'absence de *neur* provoque un phénotype neurogénique dans l'embryon dû à un défaut d'inhibition latérale au moment de la spécification des neuroblastes (Hartenstein, Rugendorff et al. 1992). Si ce phénotype est sauvé par la surexpression de *neur*, la surexpression de *mib1* n'a pas d'effet, ce qui laisse supposer qu'une fonction clé de *neur* dans l'embryon n'est pas apportée par *mib1* (Le Borgne, Remaud et al. 2005). Leurs activités ou leur régulation ne sont donc pas strictement identiques.

Mib1 a un paralogue chez la drosophile, Mib2, qui joue un rôle indépendant de la signalisation Notch dans la maintenance des muscles somatiques et viscéraux, et ne peut être remplacé par ni par Mib1, ni par Neur (Nguyen, Voza et al. 2007)

(Carrasco-Rando and Ruiz-Gomez 2008).

Chez les mammifères l'absence de Mib1 induit des phénotypes caractéristiques d'une perte de signalisation Notch, ce qui n'est pas le cas de l'absence de Neur1, Neur2 et Mib2 (Koo, Yoon et al. 2005) (Barsi, Rajendra et al. 2005) (Koo, Yoon et al. 2007). En cellule de mammifères, il semble aussi que Mib1 (et pas Neur) soit responsable de l'internalisation des ligands qui activent la signalisation Notch, et que Neur agisse en aval pour cibler les ligands vers la dégradation lysosomale et réguler ainsi le niveau de ligand disponible (Song, Koo et al. 2006). Les surexpressions de Neur1 et Mib2 ont aussi des conséquences opposées sur la signalisation Notch (Koutelou, Sato et al. 2008) (Takeuchi, Adachi et al. 2005) qui peuvent refléter des états d'ubiquitination différents (mono-/ multi-/poly-ubiquitination) des ligands. Ces différences potentielles dans le patron d'ubiquitination des ligands pourraient être responsable d'un adressage endosomal différent, via des protéines adaptatrices ou de tri interagissant avec différentes chaînes d'ubiquitines.

2.4.3 Que sait-on de la régulation des activités de Neuralized et Mindbomb ?

Le rôle des ubiquitines ligases Neur et Mib dans le trafic et l'activation des ligands n'est donc pas encore très clair. Ces ubiquitine ligases ont des domaines protéiques très différents et donc des activités et/ou des régulateurs potentiellement distincts.

Des antagonistes spécifiques de Neur ont été identifiés chez la drosophile, ce sont les membres canoniques de la famille Bearded E(spl) $m\alpha$, E(spl) $m4$, Tom et Ocho, qui sont aussi des cibles transcriptionnelles de Notch (Bardin and Schweisguth 2006). Ils interagissent directement avec le domaine NHR1 de Neur via leur motif N (Bardin and Schweisguth 2006) (Fontana and Posakony 2009) (He, Saito et al. 2009). Ce motif N est aussi présent dans la séquence intracellulaire de DI, et l'antagonisme des Bearded sur l'activité Neur se fait probablement par compétition avec DI (Bardin and Schweisguth 2006) (Fontana and Posakony 2009). L'environnement lipidique de Neuralized pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de son activité. En effet, un domaine conservé qui interagit *in vitro* avec les phosphoinositides a été identifié dans le domaine Nterminal de Neur. Ce domaine n'est pas requis pour l'interaction de

Neur avec DI, ni pour l'ubiquitination de DI, mais est nécessaire à l'activité de Neur et à l'internalisation de DI *in vivo* (Skwarek, Garroni et al. 2007).

Des interacteurs de Mib ont été isolés avec une construction GST-mib1 dans des extraits de cerveau de rats, où Mib est impliqué dans la morphogenèse neurale (Choe, Liao et al. 2007). L'analyse par spectrométrie de masse de ces interacteurs, montre une association de Mib1 avec des protéines impliquées dans le trafic membranaire (EEA1 (early endosomal antigen 1), Rab11-interacting proteins et SNAP25-like protein (synaptosomal-associated protein of 25kDa), et des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (catenin, coronin, dystrobrevin et syndecan). Mib 1 est aussi associée à des déubiquitinases comme BRCC36 et l'orthologue de fat facets, ainsi qu'à différentes kinases comme PAR 1, casein kinase II et la cyclin-dépendant kinase 5 (CDK5). La fonction de ces protéines dans la régulation de l'activité de Mib1 et dans l'endocytose des ligands reste à tester. Il a récemment été montré que PAR-1 phosphoryle Mib1 *in vivo* dans l'embryon de xénope, et inhibe l'ubiquitination et l'activité signalisatrice de Dll1 (Ossipova, Ezan et al. 2009), ce qui connecte la régulation de la signalisation Notch à la régulation de la polarité de la cellule.

2.5 Les modèles d'activation de la signalisation par endocytose des ligands

Comment l'ubiquitination et l'internalisation des ligands dans la cellule signalisatrice peut-elle être associée à l'activation du récepteur dans la cellule réceptrice ? Deux types de modèles ont été proposés. Dans le premier, l'endocytose des ligands est nécessaire lors de l'interaction avec Notch pour tirer sur le récepteur et changer sa conformation, c'est le modèle de la mécanotransduction ; et dans le second modèle, l'endocytose des ligands est nécessaire en amont de l'interaction avec Notch pour une phase d'activation des ligands, c'est le modèle de la maturation (Figure 10). Ces deux types de modèles ne sont pas incompatibles et une maturation des ligands pourrait être nécessaire à l'activation de Notch par mécanotransduction.

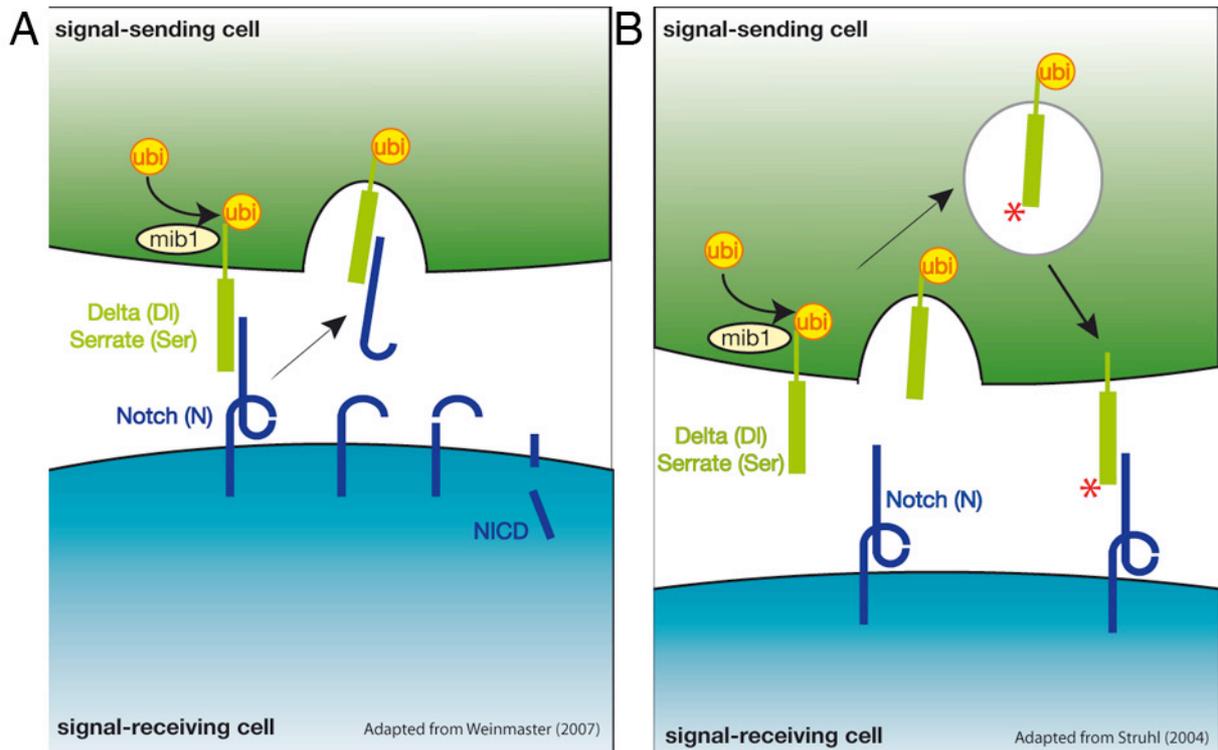


Figure 10 : Représentations schématiques des deux types de modèles permettant d'expliquer le rôle de l'endocytose des ligands dans l'activation du récepteur Notch

A : Modèle de la mécanotransduction.

L'internalisation du complexe ligand/récepteur est nécessaire à un changement de conformation du récepteur qui démasque le site de clivage S2.

B : Modèle de la maturation.

L'internalisation des ligands est nécessaire avant l'interaction avec le récepteur pour « activer » les ligands. Cette activation des ligands pourrait correspondre à une relocalisation des ligands dans un domaine membranaire propice à l'interaction avec le récepteur par exemple.

2.5.1 Le modèle de la mécanotransduction

Dans ce premier modèle, l'internalisation des ligands liés au récepteur exerce une traction sur le récepteur, ce qui induit un changement de conformation du récepteur et permet aux protéases ADAM d'accéder au site S2 et de le cliver (Parks, Klueg et al. 2000) (Figure 10 A). Ce modèle de mécanotransduction est accord avec l'observation que l'internalisation dynamine-dépendante de DI semble nécessaire à la *trans*-endocytose de la partie extracellulaire de Notch (Parks, Klueg et al. 2000). On ne sait toutefois pas si la *trans*-endocytose de Notch est nécessaire son activation, ni si l'internalisation des ligands génère une force compatible et suffisante avec le changement de configuration nécessaire à l'activation de Notch.

2.5.2 Le modèle de la maturation

Dans la deuxième catégorie de modèles, l'internalisation des ligands est nécessaire avant l'interaction avec le récepteur (Figure 10 B). Les ligands seraient donc produits d'abord sous une forme peu ou pas active et leur endocytose puis leur recyclage seraient nécessaires à leur activation. Ce modèle, dit de la maturation, est en accord avec le fait que le remplacement de la partie intracellulaire de DI par une séquence de la Low Density Lipoprotein (LDL), qui est connue pour promouvoir le recyclage du récepteur LDL, permet la signalisation et sauve même partiellement le phénotype induit par l'absence d'epsin/lqf (Wang and Struhl 2004).

La nature de cette étape d'activation intracellulaire des ligands n'est pas connue, mais différentes possibilités ont été mises en avant. Il pourrait s'agir d'une modification post-traductionnelle ou un changement de conformation des ligands induit par un changement de pH, ou encore une relocalisation des ligands dans un microdomaine membranaire qui favorise leur interaction en *trans* avec Notch.

2.5.3 L'endocytose des ligands est-elle toujours nécessaire à l'activation de Notch ?

Cette étape d'endocytose des ligands est-elle toujours nécessaire à l'activation de Notch comme c'est le cas chez la drosophile ?

Chez *C.elegans*, la situation est moins claire. D'abord, le remplacement de la partie intracellulaire de LAG-2 par la β galactosidase, qui ne devrait pas être reconnue par la machinerie d'endocytose, n'a pas de conséquence sur l'activation de GLP-1 et LIM-12 (Fitzgerald and Greenwald 1995) (Henderson, Gao et al. 1994), mais on ne sait pas comment trafique cette protéine chimérique. Ensuite, il y a chez *C.elegans* 5 ligands à domaines DSL et 3 ligands à domaines DOS solubles (Figure 3). APX-1 et DSL-1 sont solubles et ont un effet positif sur la signalisation Notch pendant le développement de la vulve (Chen and Greenwald 2004). Il a été montré que le ligand DOS soluble OSM-11, activait Notch en coopération avec le ligand DSL soluble DSL-1 et le ligand DSL transmembranaire LAG-2 (Komatsu, Chao et al. 2008). On peut donc imaginer une coopération entre ligands solubles et transmembranaires pour l'activation de Notch, et que le trafic membranaire de l'un ait des conséquences sur l'autre. D'autre part, l'Epsin est nécessaire à l'activation de GLP-1 dans le développement du cœur et des gonades (Tian, Hansen et al. 2004), sans que son

rôle dans le trafic des ligands transmembranaires n'ait été analysé. Et enfin, *mib* n'a pas d'orthologue clair chez *C. elegans*, et le *neur* putatif, F10D7.5 n'a pas de phénotype spécifique de la signalisation Notch. Le rôle de l'endocytose des ligands chez *C.elegans* n'est donc pas établi.

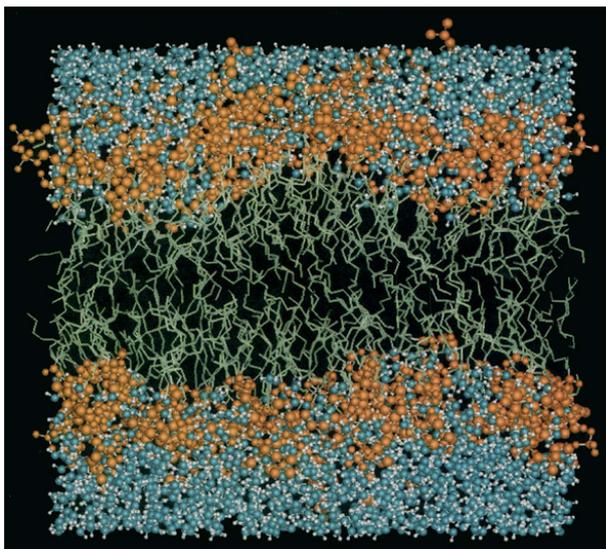
Beaucoup de points restent donc à éclaircir quant aux rôles des ubiquitine ligases Neur et Mib dans le trafic membranaire et l'activation des ligands du récepteur Notch. Quel mode d'ubiquitination catalysent-elles, une mono-/ multi-/polyubiquitination ? Avec quels partenaires, quels régulateurs ? L'ubiquitination des ligands correspond-t-elle à un signal d'internalisation et/ou un signal d'adressage endosomal ? Dans quel type d'endosome sont adressés les ligands ? Pourquoi les ligands ont-ils besoin d'être ubiquitinés et internalisés pour activer le récepteur ? Est-ce pour exercer une traction sur le récepteur et changer sa configuration ? Est-ce pour subir une modification post-traductionnel ? Est-ce pour être relocalisé dans un domaine membranaire spécifique ?

L'objectif de ma thèse était d'identifier de nouveaux acteurs de la signalisation et du trafic des ligands de Notch pour potentiellement mieux comprendre les mécanismes d'activation de Notch par l'endocytose des ligands. Mes résultats m'ayant mené vers l'analyse du rôle des glycosphingolipides dans la signalisation Notch, la dernière partie de l'introduction est consacrée aux caractéristiques et aux fonctions connues des glycosphingolipides et des domaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides.

3 Fonction des glycosphingolipides et des domaines lipidiques enrichis en cholestérol et sphingolipides

3.1 Généralité sur les membranes

Les membranes sont constituées de lipides dont la nature amphiphile fait qu'ils rassemblent spontanément leurs chaînes carbonées hydrophobes et exposent leur tête hydrophile en une double couche lipidique (Figure 11).



Adapté de (Chiu, Clark et al. 1995)

Figure 11 : La bicouche lipidique

Chiu et al (Chiu, Clark et al. 1995) modélisent une membrane artificielle composée de 100 molécules de phosphatidylcholine. La position de chaque atome est calculée toutes les 300 picosecondes. L'épaisseur de la structure, de l'interaction entre les chaînes d'acide gras des lipides des deux couches, du nombre de molécules par unité de surface, de la profondeur de l'interaction avec les molécules d'eau ou de l'irrégularité de sa surface sont à la base du modèle actuel de la bicouche lipidique.

Les molécules d'eau sont en bleu (oxygène) et blanc (hydrogène), les groupements choline sont en rouge, et les acides gras sont en vert.

La membrane plasmique présente une asymétrie en termes de composition lipidique entre leur face interne, enrichie en lipides chargés négativement, et leur

face externe, enrichie en glycolipides comme les glycosphingolipides (GSL) (Sillence 2007).

Des protéines sont associées à la membrane de différentes manières (Figure 12). Elles peuvent l'être via des domaines protéiques hydrophobes, qui établissent des liaisons non-covalentes avec les chaînes carbonées hydrophobes des lipides, et qui traversent ou pas la bicouche lipidique. Mais aussi via des associations covalentes à des ancres lipidiques comme c'est le cas des petites GTPase par exemple, ou des protéines GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) ancrées à un oligosaccharide lié à un phosphatidylinositol. Ou encore indirectement en interagissant avec des protéines membranaires.

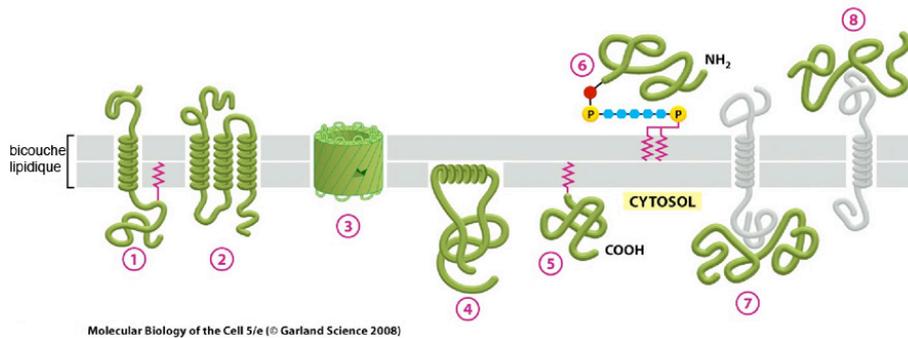


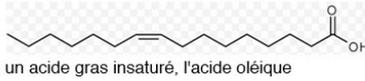
Figure 12 : Les différentes catégories de protéines membranaires

Certaines protéines traversent la membrane (1-3), alors que d'autres ne sont exposées que d'un côté (4-8). Les domaines transmembranaires sont des domaines hydrophobes qui peuvent être des hélices α (1 et 2) ou des feuilletts β enroulés sur eux-mêmes (3). Certaines protéines peuvent-être attachées de façon covalente à une chaîne d'acide gras ou à un groupe phényl (1, 5). Elles peuvent aussi être attachées à un phosphatidylinositol sur la face externe de la membrane, via un lien oligosaccharide (ancree GPI pour glycosylphosphatidylinositol, l'oligosaccharide est représenté par les hexagones bleus, 6). Enfin de nombreuses protéines ne sont reliées à la membrane que par des interactions non-covalentes avec d'autres protéines.

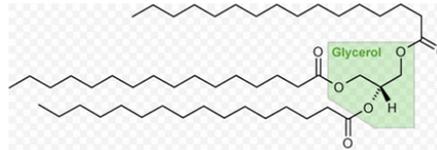
Il existe une grande variété de lipide. Une classification est présentée dans la figure 13. Les trois catégories les plus représentées dans les membranes biologiques sont les phosphoglycérides (1/2), les sphingolipides (1/5) et les stérols (1/3). La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les phosphoglycérides, et les lipides en général, les plus abondants. Ils sont considérés comme des composés structuraux de base des membranes. Les glycosphingolipides (GSLs) font partie des sphingolipides, ils sont composés d'un céramide hydrophobe

et d'une tête d'oligosaccharide hydrophile orientée dans le domaine extracellulaire. Leurs propriétés physiques sont à la base de leur comportement dans les membranes.

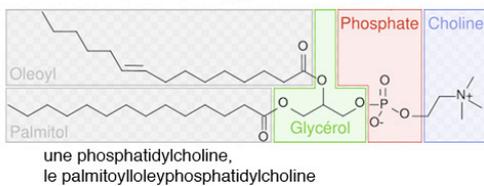
1°-Les acides gras



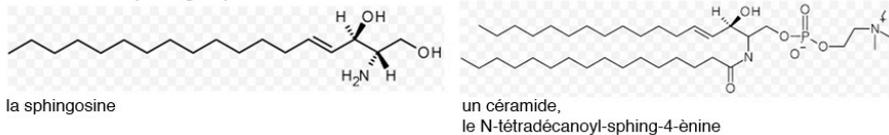
2°-Les glycérides



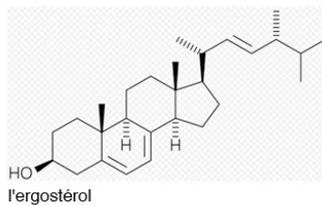
3°-Les phosphoglycérides



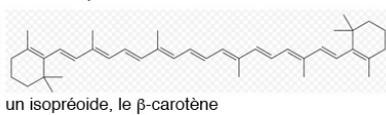
4°-Les sphingolipides



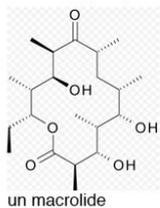
5°-Les stérols



6°-Les prényls



7°-Les polykétides



8°-Les glycolipides

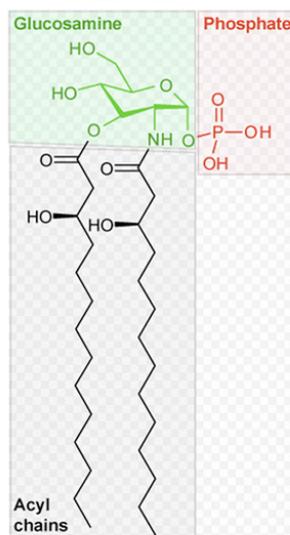


Figure 13 : Les différentes catégories de lipides

1°- les acides gras sont des acides carboxyliques caractérisés par une répétition de groupements méthylènes $-CH_2-$ formant une chaîne carbonée. C'est cette chaîne qui confère aux acides gras leur caractère hydrophobe. Les insaturations sont des doubles liaisons qui induisent des coudes dans la structure.

2°- les glycérides (ou acylglycérols) sont des esters d'acide gras et de glycérol. Selon le nombre de groupes hydroxyles sur le glycérol, on parle de mono-, di- ou tri-glycérides.

3°- les phosphoglycérides (ou phosphoacylglycérols ou glycérophospholipides) sont les lipides les plus abondants des membranes biologiques. Ils sont formés d'un ester de diacylglycérol et de phosphate. Dans la plupart des cas, le phosphate est également lié à un composé polaire hydroxylé comme la choline, la sérine, ou l'éthanolamine, on parle alors de phosphatidylethanolamine, de phosphatidylsérine et de phosphatidylcholine.

4°- les sphingolipides sont des dérivés de sphinganine ou de sphingosine qui dérivent eux même de la condensation d'un acide gras et d'une sérine. Il existe 9 sous classes de sphingolipides : les sphingosines, les céramides, les phosphosphingolipides, les glycosphingolipides neutres, acides et basiques, les glycosphingolipides amphotères et enfin les arsénosphingolipides.

La sous-classe la plus importante est celle des céramides qui correspond à une sphingosine ou une sphinganine, liée à un acide gras par une liaison amide. La sphingomyéline est un exemple connu de céramide.

5°- les stéroïdes dérivent du noyau cyclopentanophénanthrénique. Les différents types de stéroïdes se distinguent selon le nombre et la position d'insaturation et/ou de chaînes latérales. Les stéroïdes se divisent en 6 sous classes : les stéroïdes et dérivés (cholestérol, phytostérol, ergostérol...), les stéroïdes (oestrogènes, androgènes corticoïdes), les secostéroïdes, les acides biliaires, les stéroïdes conjugués et les hopanoïdes.

6°- les prénols. Leur structure de base est l'isoprène.

7°- les polykétides forment une gamme très vaste de composés naturels dont sont dérivés de nombreux antibiotiques

8°- Les glycolipides (ou saccharolipides) qui sont le résultat de l'estérification ou de l'amidification d'acide gras par des sucres. Ils se répartissent en 4 catégories, les acylaminosucres, les polysaccharides d'acylaminosucres, les acyltréhaloses, et les polysaccharides d'acyltréhaloses.

3.2 Notion d'hétérogénéité latérale des membranes et implication des glycosphingolipides

Les membranes sont donc des structures complexes dont les propriétés dérivent des effets collectifs d'un grand nombre d'interactions non-covalentes entre différentes catégories de lipides, et entre lipides et protéines. Pour analyser ces propriétés les systèmes de membranes synthétiques plus simples en termes de composition lipidique ont été utilisés.

Certains types de lipides sont capables de mettre en place plus d'interactions entre eux et de former des structures compactes ordonnées par rapport au reste de la membrane. On parle alors d'hétérogénéité latérale de la membrane car la distribution des lipides n'est pas aléatoire. Cette capacité de regroupement et de compaction dépend principalement de deux critères : la longueur de la chaîne carbonée, car plus elle est longue, plus elle peut établir d'interactions apolaires avec les lipides voisins et former une structure ordonnée, et de la présence de doubles liaisons ou insaturations qui induisent des coudes dans la chaîne carbonée et diminuent cette fois les interactions apolaires. Ainsi, les GSLs sont plus saturés que les phosphoglycérides, et contrairement aux phosphoglycérides qui n'ont que des accepteurs d'hydrogènes, les GSLs possèdent des accepteurs et des donneurs d'hydrogènes entre leur tête hydrophile et leurs chaînes carbonées. Des liaisons hydrogènes supplémentaires peuvent aussi s'établir au niveau de leurs oligosaccharides. Ces deux caractéristiques font qu'ils ont une température de fusion supérieure aux autres lipides, et qu'ils ont tendance à être plus compactés et ordonnés que les autres lipides à une température physiologique. En plus, le cholestérol, qui est le seul lipide à être entièrement polaire à l'exception de son groupe -OH, a tendance à s'associer préférentiellement via des interactions apolaires et des liaisons hydrogènes avec les GSLs qui peuvent abriter plusieurs molécules de cholestérol sous leur tête hydrophile.

Dans des membranes synthétiques composées de phosphatidylcholine (PC), de sphingomyéline et de cholestérol (1 :1 :1), la sphingomyéline se regroupe avec le cholestérol pour former des microdomaines compacts et ordonnés (Kahya, Scherfeld

et al. 2004) (Figure 14, a et b). Si ces microdomaines sont clairement observés dans les membranes artificielles composées d'un mélange lipidique, leur observation dépend des quantités relatives des différents lipides, des sondes utilisées pour détecter les différentes phases et de l'échelle à laquelle on observe la séparation de phase. Leur existence dans des membranes biologiques est restée longtemps controversée car ils sont difficiles à visualiser dans des conditions qui ne perturbent pas la composition lipidique de la membrane (voir la partie suivante concernant les méthodes d'analyse des domaines lipidiques dans les membranes biologiques). Ces domaines lipidiques sont maintenant vus comme des assemblées nanométriques et dynamiques de sphingolipides, cholestérol et protéines, qui peuvent être stabilisé par des interactions spécifiques entre lipides ou entre lipides et protéines. Ces associations dynamiques de nanodomaines forment alors des « plateformes » qui peuvent jouer des rôles dans la signalisation cellulaire et l'endocytose (Lingwood and Simons).

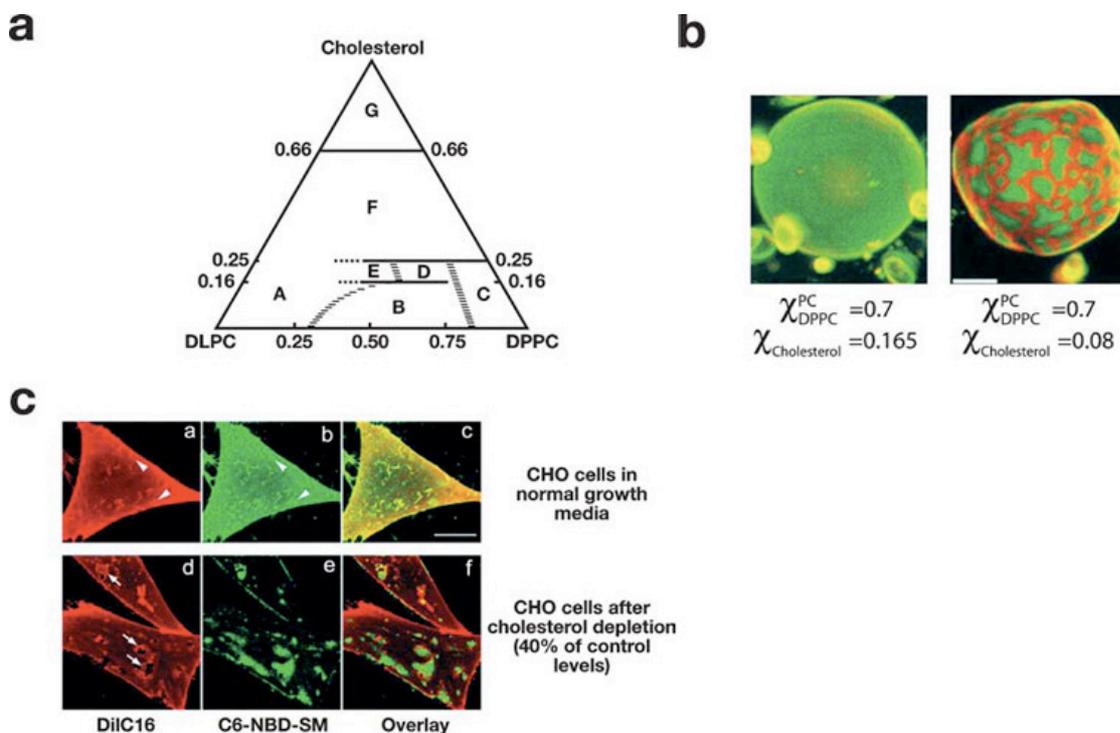


Figure 14 : La diminution du cholestérol a des effets similaires sur les phénomènes de ségrégation de phase dans les membranes modèles et dans les cellules de mammifères.

a : Diagramme de phase ternaire cholestérol /DLPC / DPPC à 24°C (DLPC pour dilauroyphosphatidylcholine, et DPPC pour dipalmitoylphosphatidylcholine). Chaque sommet correspond au composant pur. Les chiffres au niveau des axes correspondent aux fractions molaires.

A : phase lamellaire fluide riche en DLPC, B : coexistence d'une phase fluide et d'une phase ordonnée riches en DLPC, C : phase ordonnée riche en DPPC, D : une phase unique qui change continuellement d'un état rigide ordonné à la frontière C/D à un état fluide ordonné à la frontière D/E, E et F : phase ordonnée fluide, G : coexistence entre du monohydrate de cholestérol cristallisé et une phase fluide lamellaire saturée de cholestérol. Adapté de (Feigenson and Buboltz 2001)

b : La séparation de phase est analysée sur des membranes synthétiques à 24°C. Le marqueur de phase fluide, Bodipy-PC, est en vert, et le marqueur de phase ordonnée, DiLC₂₀, est en rouge. Ils sont incorporés à la vésicule à une fraction molaire de 0,001. Quand le cholestérol est à une fraction molaire au dessus de 0,16, il n'y a pas de séparation de phase apparente (à gauche). Par contre la diminution de la quantité de cholestérol à une fraction molaire de 0,08 avec une fraction constante de DPPC fait apparaître les domaines membranaires correspondant aux deux phases (à droite). Adapté de (Feigenson and Buboltz 2001)

c : Effet de la modulation de la quantité de cholestérol sur la distribution d'analogues lipidiques à la membrane plasmique de cellules CHO. Les images montrent une seule section confocal à la surface de cellules vivantes. Le marqueur de phase fluide, ordonnée, C₆-NBD-SM, est en vert, et le marqueur de phase ordonnée, DiLC₁₆, est en rouge. Ils marquent la membrane de façon uniforme dans des conditions normales de culture (a-c). Une diminution de 40% du niveau de cholestérol par un traitement à la méthyl-β-cyclodextrin ou par 3j de déplétion métabolique, induit la formation de domaines membranaire correspondant aux deux phases (d-f). L'échelle correspond à 10µm. Adapté de (Hao, Mukherjee et al. 2001).

3.3 Méthodes d'analyse de la composition et de la dynamique des domaines lipidiques dans les membranes biologiques

3.3.1 Méthodes d'isolation biochimique des domaines lipidiques résistants aux détergents

Dans les systèmes de membranes synthétiques, les microdomaines enrichis en sphingomyéline et en cholestérol résistent à la solubilisation au détergent. Dans les membranes biologiques, on retrouve aussi des fractions membranaires résistantes à la solubilisation au détergent. Les cellules sont broyées à froid avec un détergent non-ionique et les fractions de membranes sont ensuite séparées sur gradient de densité. Les protéines associées à des domaines membranaires résistants au détergent (DRM, pour detergent resistant membrane) flottent dans le gradient à faible densité, alors que les autres, solubilisées, seront retrouvées dans les fractions à forte densité (Le protocole utilisé dans le chapitre 2 est détaillé dans la partie Matériels et Méthodes). Selon les cellules et le détergent utilisés, la composition en protéines de ces DRMs varie. Cette technique peut avoir des effets artificiels car les détergents induisent des réarrangements lipidiques à plus ou moins grande échelle qui sont mal évalués (Edidin 2003) (Hao, Mukherjee et al. 2001) (Mayor and Maxfield 1995). L'environnement lipidique d'une protéine d'intérêt après solubilisation, ne reflète donc

pas forcément son environnement lipidique réel. La portion de la membrane plasmique par rapport aux membranes totales de la cellule qui se retrouvent dans les fractions résistantes au détergent n'est pas non plus très bien évaluée.

3.3.2 Des méthodes d'observation directe révèlent la dynamique de l'assemblage de ces domaines lipidiques

Les techniques d'observation directe nécessitent une résolution spatiale et temporelle de l'ordre du nanomètre et de la milliseconde sur des cellules vivantes. Le STED (Stimulated Emission Depletion fluorescent) est une technique de microscopie qui utilise la désexcitation d'un fluorochrome pour réduire la taille de la zone excitée par le laser et descendre sous la limite de résolution imposée par la diffraction avec un laser confocal standard. Cela permet par exemple d'analyser la diffusion de particules unique de lipides dans une surface de membrane d'un diamètre de 30nm. Différents lipides marqués par un fluorophore sont intégrés à la membrane de cellules. Une zone d'un diamètre de 30nm est ciblée au hasard sur la membrane et la durée du signal des molécules qui passent par cette zone est mesurée, ce qui permet de calculer les paramètres de diffusion de cette molécule. Cela a permis de montrer *in vivo*, que la sphingomyéline contrairement au phosphatidylethanolamine est séquestrée de façon transitoire dans un complexe moléculaire et que ce phénomène dépend de la quantité de cholestérol (Eggeling, Ringemann et al. 2009). L'assemblage des sphingolipides et du cholestérol en nanodomains est donc un phénomène très dynamique.

Notre compréhension des domaines lipidiques, qui était essentiellement basée sur les comparaisons avec les systèmes modèles synthétiques, change grâce à ces nouvelles techniques de visualisation à haute résolution spatio-temporelle. Nous sommes passés du modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (Singer and Nicolson 1972) dans laquelle les protéines membranaires flottaient et diffusaient librement dans une phase lipidique fluide, au modèle du radeau lipidique de Simons et Ikonen (Simons and Ikonen 1997), où l'hétérogénéité latérale de l'organisation lipidique de la membrane affecte et/ou est affectée par les protéines membranaires. La métaphore du radeau n'est aujourd'hui plus valable à cause de l'assemblage et du désassemblage extrêmement dynamique de ces nanodomains lipidiques.

3.4 Comment est contrôlée la dynamique de la ségrégation des domaines lipidiques ?

La question du contrôle de la ségrégation des lipides dans ces nanodomains reste ouverte. Il est probable que la membrane plasmique ait une composition proche du point de transition de telle sorte que son hétérogénéité latérale soit contrôlable localement par des protéines. Certaines protéines encore mal identifiées, pourraient par leur interaction avec les lipides et des protéines transmembranaires ou périphériques, former un échafaudage, une coquille qui favorise l'assemblage de lipides.

La caveoline et la flotillin sont de bons candidats qui pourraient favoriser l'assemblage de domaines lipidiques. Le cytosquelette d'actine pourrait aussi jouer un rôle. En effet des études qui analysent par FRET (Fluorescence resonance energy transfer) le rôle du cytosquelette d'actine dans le regroupement de protéines associées aux domaines lipidiques, montrent que la latrunculin B qui perturbe le cytosquelette d'actine, bloque le regroupement de ces protéines, et que la jasplakinolide, qui au contraire induit la polymérisation de l'actine, augmente leur regroupement (Chichili and Rodgers 2007). En plus, un marqueur dont le spectre d'émission change avec le degré d'organisation des lipides, le Laurdan, montre une corrélation entre les domaines riches en actine et l'organisation de la membrane (Gaus, Chklovskaja et al. 2005) dans des lymphocytes T activés.

3.5 La composition lipidique des membranes de cellules de drosophile est théoriquement compatible avec la formation de microdomaines lipidiques

L'analyse de la composition lipidique des membranes cellulaires de la drosophile ne révèle pas de différences majeures avec celle des cellules de mammifères (Rietveld, Neutz et al. 1999). Les phosphoglycérides sont les mêmes que chez les mammifères et sont saturés à 60% comme chez les mammifères, mais leurs chaînes carbonées sont plus courtes (C18 au lieu de C24). Les chaînes carbonées des sphingolipides sont aussi plus courtes que chez les mammifères (C20 au lieu de C24) et sont saturées. Les GSLs majoritaires sont le glucosylcéramide (N1) et le mannosylglucosylcéramide (N2) (Figure 16 B). La sphingomyéline n'est pas présente et est remplacée par la phosphoéthanolamide céramide. Ces différences de longueur de chaînes carbonées impliquent une température de fusion plus basse. La drosophile ne régulant pas sa température interne à la différence des mammifères qui se maintiennent à 37°C, une température de fusion plus basse pour certains types de lipides est cohérente avec la nécessité de garder une membrane fluide à des températures fluctuant entre 15° et 30°C. Le stérol principal chez la drosophile est l'ergostérol qui provient directement des levures qui constituent son régime alimentaire (Rietveld, Neutz et al. 1999). En effet, la drosophile est auxotrophe vis-à-vis des stérols et ne possède pas d'homologue de l'hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A synthase, enzyme responsable de la première étape de la néosynthèse de stérol à partir d'acétyl-CoA.

La composition lipidique des membranes de cellules de drosophile est donc très semblable à celle des cellules de mammifères et théoriquement compatible avec la formation de microdomaines lipidiques ordonnés.

3.6 Fonction des glycosphingolipides dans l'endocytose

La bicouche lipidique de la membrane plasmique n'est donc pas seulement une structure passive et les lipides peuvent s'associer transitoirement en domaine. Quel est le rôle de ces domaines lipidiques dans l'endocytose ? et plus précisément quel est le rôle des GSLs dans l'endocytose ?

Pour le savoir, deux approches sont possibles. La première vise à suivre le trafic membranaire d'analogues des GSLs qui s'intègrent à la membrane, ou à suivre le trafic membranaire de toxines qui fixent des pentamères de GSLs.

La deuxième approche vise à perturber la formation de ces domaines lipidiques en extrayant ou en séquestrant le cholestérol biochimiquement, ou en jouant génétiquement sur les voies de biosynthèse, et à observer les conséquences sur le trafic membranaire.

3.6.1 Utilisation d'agents qui extraient ou séquestrent le cholestérol et d'analogues des GSLs

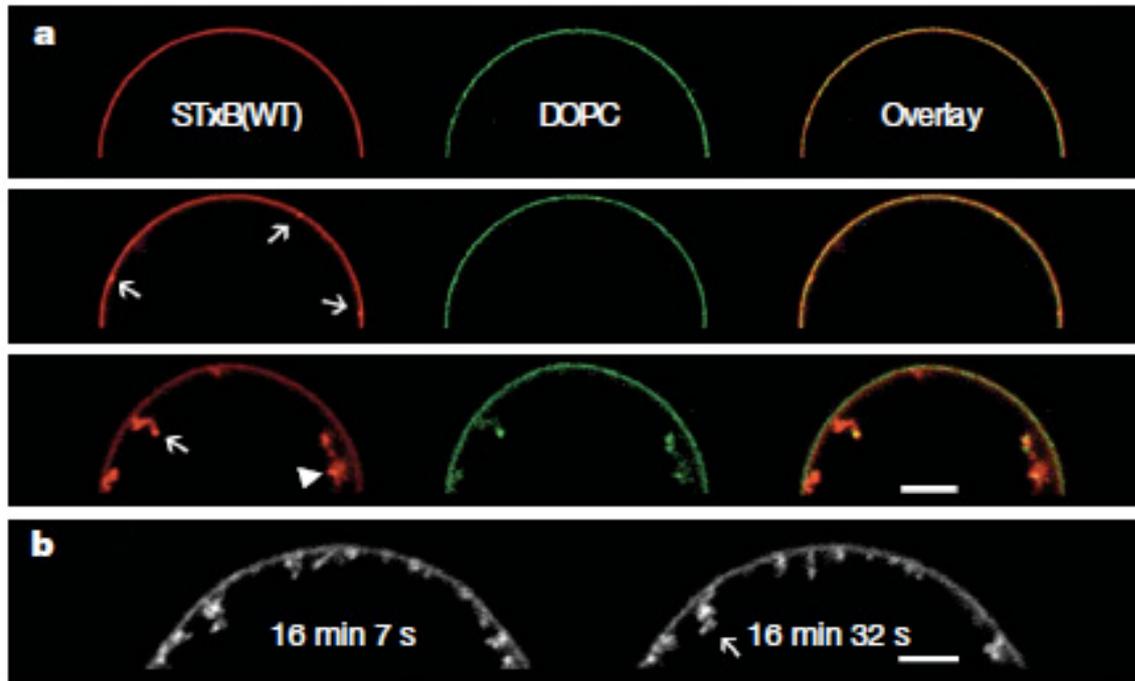
Les agents qui extraient (comme le MBCD, β -methylcyclodextrin) ou séquestrent (comme la filipin ou la nystatin) le cholestérol, modifient la composition lipidique de la membrane, perturbent l'assemblage de microdomaines lipidiques, ainsi que l'internalisation de cargos par la voie clathrine et la voie caveoline. Les conséquences de ces déplétions en cholestérol diffèrent selon le type de cellules utilisées parce que les conditions d'utilisation de ces agents varient, et/ou probablement aussi parce que la composition lipidique des différents types cellulaires utilisés est différente. Il semble néanmoins qu'une modulation modérée du cholestérol membranaire ait peu d'effets sur la voie clathrine, alors qu'elle affecte clairement les voies indépendantes de la clathrine et particulièrement la voie caveoline.

3.6.2 Suivie du trafic d'analogues de GSLs et de toxines

Les analogues fluorescents des GSLs qui s'intègrent à la membrane, comme le BODIPY LacCer, ainsi que la toxine Shiga (STx dont le récepteur est Gb3) et la toxine du Choléra (CTx dont le récepteur est GM1) peuvent aussi suivre des voies différentes selon les types de cellules utilisés.

Dans les fibroblastes humains par exemple, LacCer est internalisé à la membrane plasmique indépendamment de la clathrine par une voie liée à la caveoline, puis est rapidement dirigé dans les endosomes précoces positifs pour Rab5 et divisé en deux parties. Une partie est adressée à l'appareil de Golgi par la voie rétrograde et cet adressage dépend des microtubules, d'une phosphatidylinositol 3-kinase, de Rab7 et de Rab9 (Puri, Watanabe et al. 2001) (Choudhury, Dominguez et al. 2002). Une autre partie est recyclée à la membrane après un passage indépendant de Rab5a, dans les endosomes précoces, puis dans les endosomes Rab11.

L'interaction de la STx avec Gb3 induit des réarrangements de lipides en faveur d'une courbure négative et entraîne la formation de tubules aussi bien sur des membranes modèles que des cellules (Figure 15) (Romer, Berland et al. 2007). Une fois internalisé, le complexe GSL/toxine peut être recyclé à la membrane via les endosomes Rab11, mais il utilise majoritairement la voie rétrograde des endosomes précoces vers le Golgi et le réticulum endoplasmique (via syntaxin16 et Rab6a) (Smith, Lord et al. 2004) où les toxines sont libérées.



Adapté de (Romer, Berland et al. 2007)

Figure 15 : Reconstitution de la formation de tubules sur des membranes synthétiques par la toxine Shiga

a, panneau supérieur : La sous unité B de la toxine Shiga (STxB, en rouge) se fixe à la membrane de la vésicule géante composée de DOPC (en vert), de cholestérol et de Gb3 (5% mol).

a, panneau du milieu : STxB forme des clusters (indiqués par des flèches).

a, panneau inférieur et b : STxB induit l'invagination et la tubulation de la membrane.

3.6.3 Analyse des conséquences de la modulation de la voie de biosynthèse des GSLs

La génétique permet de moduler la voie de biosynthèse des GSLs en inactivant les différentes enzymes impliquées.

La chaîne de sucres des GSLs est synthétisée par des glycosyltransférases dédiées, localisées dans le Golgi et qui agissent de façon séquentielle sur la base céramide. Il existe différentes séries de GSLs chez les mammifères, la globo-série, la lacto-série et la ganglio-série. Elles sont toutes basées sur un glucosylcéramide, mais diffèrent au niveau de la séquence de leur oligosaccharide (Kolter, Proia et al. 2002) et sont enrichies dans des types cellulaires différents.

Chez la drosophile et *C. elegans*, il n'y a qu'une seule classe de GSLs, l'arthro-série, qui est basée sur un glucosyl-céramide ce qui simplifie l'analyse de leur fonction (Figure 16 B). L'absence de la glucosylcéramide synthase (Glc-T) qui catalyse la

première étape de glycosylation du céramide, entraîne l'accumulation de céramide et de sphingosine-1-phosphate (Kolesnick and Kronke 1998) qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose (Figure 16 A). Chez la souris, le mutant *Glc-T* meurt au début de la gastrulation à cause d'une augmentation de l'apoptose au niveau de l'ectoderme (Yamashita, Wada et al. 1999). Chez la drosophile aussi une augmentation de l'apoptose est observée quand l'expression de *Glc-T1* est éteinte par RNAi (Kohyama-Koganeya, Sasamura et al. 2004). Ce rôle des céramides et de la sphingosine-1-phosphate dans la régulation de l'apoptose pourrait masquer un rôle potentiel dans la régulation de l'endocytose.

Chez la drosophile, les 2^{ème} et 3^{ème} étapes de l'élongation sont catalysées respectivement par Egghead (Egh) et Brainiac (Brn). Ces mutants sont létaux au stade pupal, et leur analyse en clone montre qu'ils sont essentiels à la maintenance, mais pas à la spécification, de l'épithélium folliculaire (Goode, Melnick et al. 1996). Ces enzymes sont requises dans les cellules de la lignée germinale pour la maintenance de l'épithélium folliculaire adjacent, elles fonctionnent de façon non autonome cellulaire. Un allèle thermosensible viable de *brn* (*brn^{ts107}*) a permis de mettre en évidence un phénotype de fusion des appendices respiratoires de l'embryon qui est associé à un défaut d'activation de la voie EGF et plus précisément à un défaut dans la formation et la portée du gradient de son ligand Gurken (Pizette, Rabouille et al. 2009).

Chez *C. elegans*, les mutants des orthologues *d'egh* et de *brn*, respectivement *bre-3* et *bre-5*, ne présentent pas de phénotypes détectables, ils sont viables et fertiles (Griffitts, Haslam et al. 2005), mais ils ont été identifiés dans un crible pour une résistance à la toxine du *Bacillus thuringiensis* (Bt) (*bre* pour Bt resistance (Griffitts, Whitacre et al. 2001). Dans ces mutants, la toxine n'est plus internalisée dans les cellules intestinales, alors que l'internalisation de marqueurs lipophiles ou de la phase fluide ne semble pas perturbée. Les produits de *bre-3* et *5* jouent donc le rôle de récepteur de la toxine et permettent leur internalisation.

Les GSLs ont donc un rôle de récepteur qui permet l'internalisation de toxines. Ils sont aussi potentiellement impliqués dans le recyclage à la membrane plasmique via les endosomes Rab11 et dans l'adressage au Golgi et au réticulum par la voie rétrograde de certaines de ces toxines.

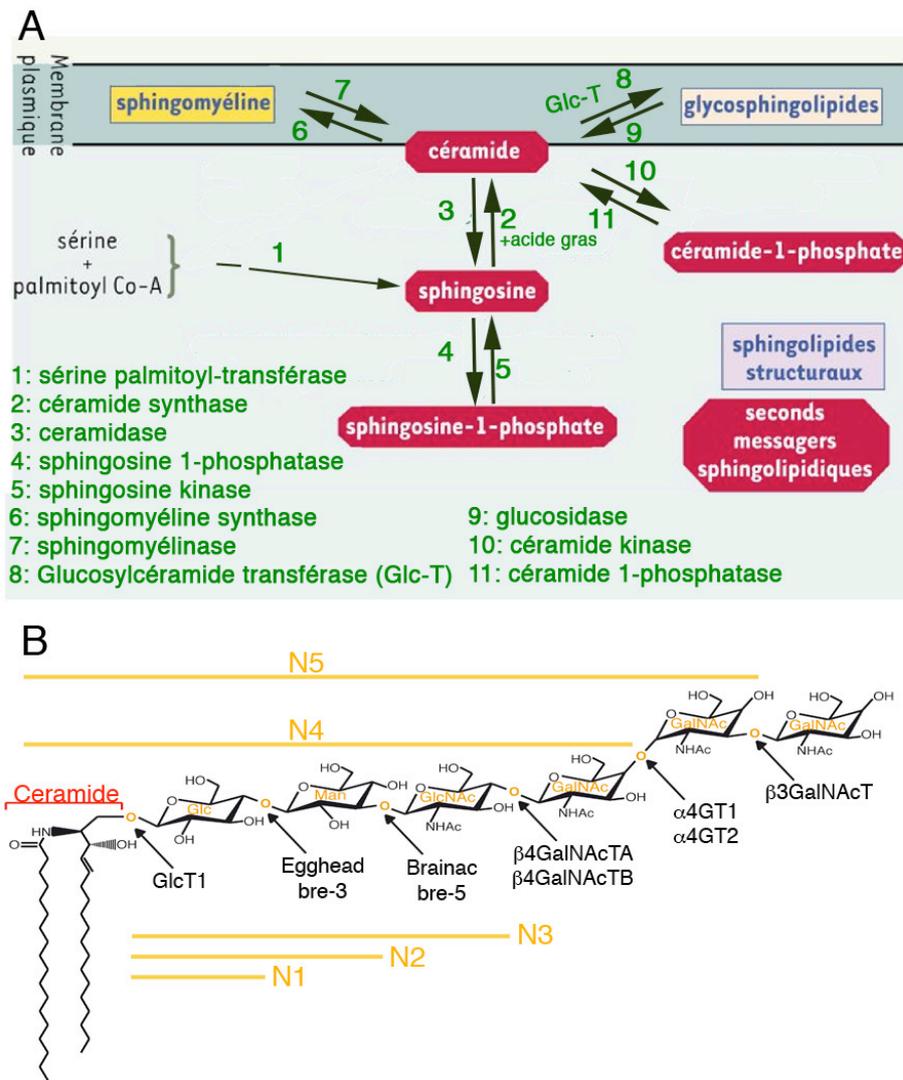


Figure 16 : Voies de biosynthèses des céramides et des glycosphingolipides

A : Voies de biosynthèse du céramide.

Le céramide peut être produit *de novo* dans le réticulum endoplasmique, par condensation de sérine et de palmitoyl-CoA (1) puis acylation de la base sphingoides (2), par hydrolyse de la sphingomyéline (7), ou déglycosylation des glycosphingolipides (8).

La sphingosine 1-phosphate, la sphingosine, le céramide et de céramide 1-phosphate sont tous impliqués dans l'apoptose (encadrés en rouge), alors que la sphingomyéline, et les glycosphingolipides sont des lipides structuraux de la membrane plasmique. Les enzymes impliquées dans chaque étape sont indiquées par un code chiffré.

Adapté de (Malagarie-Cazenave, Andrieu-Abadie et al. 2002)

B : Structure des GSLs chez la drosophile. Les GSLs correspondent à un céramide (Cer) sur lequel est ajouté un oligosaccharide de taille variable. Les enzymes qui ajoutent ces sucres de façon séquentielle sont indiquées en noir et leur produit sont indiqués en jaune (N1-5).

La glucosyltransférase1 (GlcT1) catalyse l'addition du premier glucose et la production d'un glucosylcéramide, Glc β 1-1Cer, appelé N1.

Egghead (Egh, bre-3 chez *C. elegans*) ajoute ensuite un mannose et produit un Man β 1-4Glc β 1-1Cer appelé N2.

Brainiac (Brn, bre-5 chez *C. elegans*) ajoute un résidu NAcétylglucosamine et produit donc un GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cer appelé N3.

β 4GalNAcTA et TB sont deux enzymes redondantes qui ajoutent un résidu NAcétylgalactosamine et produisent N4, un GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cer.

α 4GT1 et α 4GT2 allonge la chaîne de sucre de N4 *in vitro* en ajoutant un résidu NAcétylgalactosamine et produisent N5, un GalNAc α 1-4GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cer.

Objectifs de ma thèse

L'objectif de ma thèse était d'identifier et de caractériser de nouveaux acteurs impliqués dans la régulation du trafic et de l'activité des ligands de Notch chez la drosophile. J'ai pour cela d'abord réalisé un crible visant à identifier de nouveaux interacteurs génétiques de *mib1*. Les résultats du crible font l'objet chapitre 1. J'ai ensuite analysé la fonction d'un candidat issu du crible : α 4GT1, ce qui m'a amené à analyser le rôle des glycosphingolipides dans la signalisation Notch.

CHAPITRE 1:

Un crible génétique pour identifier de nouveaux régulateurs du trafic et de l'activité signalisatrice des ligands de Notch chez la drosophile

Résumé du chapitre 1

Objectif :

Si l'importance de l'ubiquitination et du trafic membranaire des ligands de Notch est bien établie (Le Borgne, Bardin et al. 2005), on n'explique pas encore le mécanisme par lequel l'internalisation des ligands dans la cellule émettrice du signal permet l'activation du récepteur dans la cellule signalisatrice. On ne sait que peu de choses sur la ou les fonctions de Mib1 dans l'endocytose des ligands, ainsi que sur ses partenaires et régulateurs. Une approche génétique ouverte a donc été choisie afin d'identifier de nouveaux interacteurs génétiques de *mib1* qui sont de potentiels régulateurs du trafic et de la signalisation des ligands de Notch. J'ai donc réalisé un crible modificateur basé sur un phénotype de perte partielle d'activité *mib1* dans l'aile pour identifier de nouveaux interacteurs génétiques de *mib1*. En d'autres termes, j'ai diminué l'activité signalisatrice des ligands de Notch soit en surexprimant une version dominante négative de Mib1, soit en diminuant le niveau d'expression de *mib1* par RNAi, et j'ai isoler les gènes capables de modifier ce phénotype en le sauvant ou en l'aggravant.

Principe du crible

Les éléments GS sont des transposons insérés dans le génome qui permettent l'activation conditionnellement, grâce au système UAS-GAL4, de la transcription des gènes situés de part et d'autre de leur site d'insertion. J'ai testé la capacité d'une collection d'éléments GS insérés au hasard dans le génome à modifier, en le sauvant ou en l'aggravant, le phénotype de perte partielle d'activité *mib1* dans l'aile. Le choix de cribler des gènes potentiellement surexprimés par l'activation des éléments GS est motivé par la volonté de révéler la fonction de gènes qui seraient masqués en perte-de-fonction par une redondance fonctionnelle. Les éléments GS qui interagissent génétiquement avec les pertes partielles de *mib1* utilisées activent de potentiels régulateurs du trafic des ligands, mais aussi des acteurs qui agissent en aval ou en parallèle de l'activation du récepteur Notch.

Le crible a été fait en deux étapes. Le crible primaire a permis de sélectionner les lignées GS qui avaient un effet suppresseur sur le phénotype induit par un dominant-négatif de Mib1, Mib1^{C1205S}, spécifiquement exprimé dans l'aile où Mib1 est requis pour la signalisation Notch. Mib1^{C1205S} correspond à une version catalytiquement inactive de Mib1 qui a été créée par homologie avec un mutant du Mib1 de poisson zèbre qui est toujours capable d'interagir avec les ligands DSL mais sans pouvoir les ubiquitiner (Zhang, Li et al. 2007). Le phénotype induit par la surexpression de Mib1^{C1205S} dans l'aile est caractérisé en détail dans l'article du chapitre 2. La surexpression de Mib1^{C1205S} bloque le trafic des ligands par compétition avec le Mib1 endogène. L'activité signalisatrice des ligands, l'activation de Notch, et la spécification des cellules de la marge de l'aile est donc partiellement bloquée.

Pour faire le tri parmi ces lignées et confirmer leur interaction génétique avec une diminution de l'activité *mib1*, un crible secondaire a été réalisé toujours dans l'aile mais sur le phénotype induit par la diminution du niveau d'expression de *mib1* par RNA interférence (le phénotype induit par *mib1*^{RNAi} dans l'aile est caractérisé en détail dans l'article du chapitre 2 Figure 3, 5, S1, S2 et S3). Le trafic et l'activité signalisatrice des ligands sont alors bloqués par la diminution du niveau endogène de *mib1*. Les lignées GS qui sauvent les phénotypes induits par la surexpression du dominant-négatif Mib1^{C1205S} et par la diminution du niveau endogène de *mib1* (*mib1*^{RNAi}) surexpriment potentiellement des régulateurs positifs de la signalisation Notch. Ces régulateurs positifs peuvent agir au niveau du trafic et de l'activation des ligands ou en aval de cette étape. Les lignées GS qui sauvent le phénotype induit par Mib1^{C1205S} mais aggravent le phénotype induit par *mib1*^{RNAi} surexpriment potentiellement des régulateurs négatifs de *mib1* capable d'inactiver le dominant négatif et de rééquilibrer la compétition entre Mib1 endogène et Mib1^{C1205S}.

Résultats du crible :

4180 éléments GS ont été criblés et 98 ont été retenus pour leur effet suppresseur fort sur le phénotype induit par Mib1^{C1205S}, ce qui correspond à 2,3% des lignées criblés. Parmi les 98 lignées sauvant le phénotype Mib1^{C1205S}, 7 lignées GS sauvent aussi le phénotype induit par *mib1*^{RNAi}. Deux insertions GS parmi ces 7 lignées sont localisées à proximité de *neuralized*. Neuralized est déjà connu pour avoir une

activité moléculaire partiellement redondante avec Mib1 dans l'aile (Le Borgne, Remaud et al. 2005), sa surexpression sauvant la perte d'activité *mib1* dans l'aile. Ce résultat confirme que les éléments GS permettent de surexprimer des gènes à proximité de leur point d'insertion et d'identifier ainsi des régulateurs de l'ubiquitination des ligands.

Parmi les 98 lignées sauvant le phénotype Mib1^{C1205S}, 7 autres lignées ont un effet aggravateur sur le phénotype induit par *mib1*^{RNAi}, ou induisent en contexte sauvage un phénotype correspondant à un défaut d'activation de Notch dans l'aile. Ces GS surexpriment potentiellement des régulateur négatif de *mib1*.

Identification des gènes responsables des interactions GS/mib1 :

Il s'agissait ensuite d'identifier le gène responsable de l'interaction génétique entre ces 14 éléments GS et *mib1*. La plupart des insertions GS criblées ont des promoteurs bidirectionnels qui leur permettent d'activer la transcription, sens ou anti-sens, de plusieurs gènes de part et d'autre leur point d'insertion. Afin de déterminer des règles générales qui régissent l'effet des GS sur l'expression des gènes adjacents, De Celis et al (Molnar, Lopez-Varea et al. 2006) ont réalisé des séries d'hybridation *in situ* pour détecter l'ARN sens et anti-sens des gènes adjacents à ces éléments GS bidirectionnels. Ils concluent que le gène le plus proche de l'élément GS, orientés dans le sens des promoteurs du GS, est toujours ectopiquement transcrit, alors que les gènes plus distants (et orientés dans le sens du promoteur du GS) ne le sont pas forcément. Ils ne détectent jamais de production d'ARN anti-sens même pour les gènes orientés dans le sens inverse des promoteurs du GS. L'absence de détection d'ARN anti-sens ne signifie pas qu'il n'est pas produit et qu'il n'a pas un effet d'interférence sur l'expression endogène des gènes. J'ai toutefois restreint la liste des gènes candidats aux gènes orientés dans le sens des promoteurs et dans une fenêtre arbitraire de 5Kb pointés par chaque promoteur du GS, la portée d'activation du Gal4 n'étant pas connue. Les lignées RNAi des gènes candidats permettent de bloquer spécifiquement l'expression de ces gènes dans le contexte du sauvetage du phénotype Mib1^{C1205S} par leur GS respectif. Si une lignée RNAi bloque le sauvetage du phénotype Mib1^{C1205S} par le GS, c'est que la surexpression du gène ciblé par le RNAi est nécessaire au sauvetage. Cette

stratégie d'identification par RNAi est présentée en détail dans les annexes du chapitre 1. Elle a permis d'identifier $\alpha 4GT1$ et Hsc-70-4 comme étant des interacteurs de *mib1*, mais n'a pas permis une identification systématique des interacteurs correspondant à chaque élément GS. L'analyse du rôle de la glycosyltransférase $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch fait l'objet du chapitre 2. Et le rôle de Hsc70-4 dans la régulation du trafic dépendant de la clathrine et la signalisation des ligands DSL reste à analyser.

A modifier gain-of-function screen to identify new regulators of *mindbomb1* dependant DSL trafficking and signaling in *Drosophila* wing

Sophie Hamel¹ and François Schweisguth^{1,2}

1 Institut Pasteur, CNRS URA2578, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex15, France

2 corresponding author: fschweis@pasteur.fr

Words: 6600

ABSTRACT

The Notch signaling pathway regulates a wide range of cell fate determination and pattern formation across the metazoans. Notch receptor is activated by its DSL (Delta, Serrate, Lag-2) transmembrane ligands and signals directly to the nucleus via a series of proteolytic cleavages. Notch activity is controlled in space and time by different mechanisms among which DSL ligands ubiquitination and trafficking. Mindbomb1 (Mib1) is a conserved E3 ubiquitin ligase essential for Notch activation, that binds the DSL, ubiquitinates them and regulates their internalization and/or their endosomal sorting. The mechanisms whereby ubiquitination regulates DSL trafficking and signaling activity are still poorly understood.

To gain novel insight in Mib1-dependant DSL signaling, we performed a genetic screen in *Drosophila* aimed at identifying new interactors of *mib1* and potential regulators of DSL signaling. Specifically we have screened a collection of 4180 Gene Search (GS) lines that allows overexpression of genes located around their GS insertion point, and selected 98 lines that suppress the wing margin phenotype induced by a dominant-negative version of Mib1. Then among these 98 candidates we selected 14 lines that modified, by suppression or enhancement, the wing margin phenotype induced by RNAi, reduced level of *mib1* expression, and identified *neuralized*, *α4GT1* and *Hsc70-4* as genetic interactors of *mib1*.

INTRODUCTION

Cell-cell signaling mediated by Notch receptors is an evolutionary conserved pathway iteratively involved in numerous developmental processes in Metazoans including stem cell maintenance, cell specification, patterning and morphogenesis. Dysregulation of Notch normal signaling activity has been associated with different pathologies (HARPER *et al.* 2003) and inherited genetic disorder such as Alagille syndrome (ROCA and ADAMS 2007) and cancers like T-ALL (WENG *et al.* 2004).

Notch is a transmembrane protein with an intracellular domain corresponding to a transcriptional coactivator tethered at the plasma membrane. Signaling occurs when the transmembrane ligands DSL (Delta, Serrate, Lag-2) expressed on the surface of one cell interact with Notch extracellular domain on the surface of an apposing cell, inducing the release of Notch Intracellular Domain (NICD) from the membrane by a series of proteolytic cleavages. NICD is then translocated into the nucleus and interacts with a transcriptional factor CSL (CBF1/RBPJk in mammals, Su(H) in flies and LAG-1 in worms) to activate downstream target genes. Activation of Notch signaling is direct, has no amplification step and is irreversible but is nevertheless regulated by a plethora of post-translational modification like glycosylation, and ubiquitination at both receptor and ligands levels (see (BRAY 2006) (D'SOUZA *et al.* 2008) (FORTINI 2009) (KOPAN and ILAGAN 2009) for recent reviews).

One conserved and key mechanism of Notch signaling regulation involved ubiquitination and endocytosis of the DSL ligands, Delta and Serrate in *Drosophila* (LE BORGNE *et al.* 2005a). Genetic and cellular studies have shown that ubiquitination of DSL by the E3 ubiquitin ligases Neuralized (Neur) and/or Mindbomb1 (Mib1) controls their endocytic trafficking, and are essential for Notch activation (ITOHO *et al.* 2003) (LAI *et al.* 2005) (LE BORGNE *et al.* 2005b) (Deblandre 2001, Lai 2001, Pavlopoulos 2001, Yeh 2001, Le borgne 2003). Moreover several proteins associated with endocytosis have been involved in DSL activity regulation like clathrin, dynamin (SEUGNET *et al.* 1997) (PARKS *et al.* 2000), epsin (WANG and STRUHL 2004) (OVERSTREET *et al.* 2004), or auxilin (EUN *et al.* 2008) (HAGEDORN *et al.* 2006). Models have been proposed to address roles for DSL ubiquitination and endocytosis both before and after binding to Notch (WANG and STRUHL 2005) (LE BORGNE *et al.* 2005a) but have not been demonstrated. Mib1 and Neur have overlapping molecular activities but have distinct

structures (LE BORGNE *et al.* 2005b). Very few is known about their post-traductional regulation, their respective partner in the endocytic machinery.

To gain novel insights into *mib1* dependant DSL signaling we performed a genetic modifier screen in the *Drosophila* wing where *mib1* activity is required for Notch activation, wing margin cell specification, and wing growth.

Drosophila success as a model organism comes greatly from the power of genetics screen. Modifier screens in particular allow the identification of missing players of a signaling pathway. Most of the genes are either recessive in loss-of-function or do not show any phenotype by overexpression. When the signal transduction is already disrupted by a partial inactivation of one important player like *mib1*, the expression level of the other players can become important and it is informative to look for genes that can suppress or enhance this *mib1* sensitized genetic background. Moreover, a lot of genes are non essential, potentially because of a functional redundancy. They will be missed by a loss-of-function approach, one gene compensating for the absence of the other. Thus, the UAS-GAL4 system that allows conditional ectopic expression, associated with *P-elements* inserted randomly in the genome allows gain-of-function screen (RORTH *et al.* 1998) and we used the Gene Search (GS) collection (TOBA *et al.* 1999) to design a gain-of-function modifier screen on two different partial loss of *mib1* activity in the wing. We screened a collection of 4180 Gene Search lines and isolated in a primary screen 98 suppressors of a dominant-negative version of Mib1 (Mib1^{C1205S}). Among these 98 GS lines, 7 also suppress the phenotype induced by the down-regulation of *mib1* expression by RNAi (*mib1*^{RNAi}), and potentially overexpress a positive regulator of Notch signaling at the level of Notch ligand activation or downstream. 7 others GS lines are Mib1^{C1205S} suppressors and *mib1*^{RNAi} enhancers and are potential Mib1 negative regulators. We identified *neur*, *α4GT1* and *Hsc70-4* as genetic interactors of *mib1* and DSL signaling and trafficking.

MATERIAL AND METHODES

Drosophila stocks

The collection of 4180 GS lines was generated by the Drosophila Gene Search (GS) Project (<http://gsdb.biol.metro-u.ac.jp/~dclust/index.html>). The *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}* chromosome was obtained by recombining previously described transgenes (<http://flybase.org/>). *UAS-mib1^{C1205S}* flies and *UAS-mib1* flies are described in (LE BORGNE et al. 2005b). The phenotype of *UAS-mib1^{C1205S} ; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}* (noted *Ser>mib1^{C1205S}*) is investigated at a subcellular level in a paper to be published, about the role of one candidate from the screen *α4GT1*, in Notch signaling.

UAS-p35 flies correspond to BL5072 stock at Bloomington. The *mib1* mutant wing (Figure 1, C) corresponds to *mib1²/mib1³* null trans-heterozygous combination described in (LE BORGNE et al. 2005b). The *UAS-mib1^{RNAi}* line was obtained from the VDRC (line ID27525; <http://www.vdrc.at/>) and recombine with *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}* or *Ser-Gal4 Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}* chromosomes.

Screen conditions

Females from 4180 GS insertion stocks were crossed with *UAS-mib1^{C1205S}/Y; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}* males at 25°C for 2 or 3 days and the progeny was transferred at 28°C at the second instar larval stage to allow post-embryonic Gal4-dependant expression. Males progeny *Y/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/GS* give the phenotype of GS activation in the wing, and female progeny, *UAS-mib1^{C1205S} /+; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/GS*, give the phenotype of GS and Mib1^{C1205S} co-expression in the wing.

The 98 GS lines suppressing significantly the wing phenotype induced by Mib1^{C1205S} overexpression were then crossed in the same condition with the *Ser-Gal4 Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}UAS-mib1^{RNAi}* lines (noted *Ser x2>mib1^{RNAi}*) to select GSs that modify by suppression or enhancement, the *mib1^{RNAi}*-induced phenotype in the wing. To facilitate the observation enhancers of *mib1^{RNAi}* phenotype we also used *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}UAS-mib1^{RNAi}* lines (noted *Ser x1>mib1^{RNAi}*) that overexpressed *mib1^{RNAi}* at a lower level. This level of *mib1^{RNAi}* expression did not show any phenotype at

28°C in a wild type background, but shows wing nicks in a heterozygous background for *mib1* (*mib1*^{2/+}, *mib1*^{3/+}).

GS mapping, genes annotation and gene ontology analysis

The genomic mapping of all GS-elements is available on the Drosophila Gene Search Project web site (<http://gsdb.biol.metro-u.ac.jp/~dclust/index.html>). The position of the 14 GSs that suppress *mib1*^{C1205S} phenotype and modify *mib1*^{RNAi} phenotype has been checked by PCR on genomic DNA with one primer in the 31-pb of the terminal inverted repeat of the GS-element and oriented outward (sequence Pout: cgacgggaccaccttatgttatttcatcat) and the other in the expected genomic region. Amplification of DNA fragment of the expected size in 13 out of 14 stocks confirmed their insertion site. The GS13030 were remapped by inverse PCR according to the protocol of Berkeley Drosophila Genome Project and with primers indicated by the Drosophila Gene Search Project web site (5pIn: ctccgtagacgaagcgctctattt; 5pOut: ctgaataggaattggaattcgactagtt, 3pIn:gcaaagcttgctgcaggctcgagc, 3pOut: taattcaaaccacggacatgctaag).

For each GS suppressing *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype in the wing, the two closest genes in the 5kb window pointed by each GS promoter and in respect to promoters orientation were taken into consideration (Figure 3). Thus, these 98 GSs correspond to 123 CGs and 4 CRs, after elimination of duplicated genes. 41 of them don't have any molecular function attributed in flybase, and the 86 other genes have at least one attributed molecular function gene ontology (GO). Since each gene can be annotated with several GO, this list of 86 genes corresponds to a list of 202 GOs. To test if some GO that came up at least 2 times in the screen, are overrepresented or not, we calculated the ratio between number of GO apparition in the screen over the number of GO apparition in the genome (Figure 3B). A random representation corresponds to 0,3% of the GO apparition in the genome.

RESULTS

Mib1^{C1205S} interferes in a dominant-negative manner with endogenous Mib1 activity and partially blocks DSL signaling and trafficking

To gain novel insights into DSL signaling and its regulation by Mib1 we performed a genetic modifier screen for gain-of-function suppressors of a dominant-negative form of Mib1: Mib1^{C1205S} (BARDIN and SCHWEISGUTH 2006). This mutant form of Mib1 corresponds to a substitution of a highly conserved cysteine of the catalytic C-terminal Ring Finger domain for a serine (C1205S). This mutation was engineered by homology with the zebrafish Mib1^{C1009S} (*tfi101*) that disrupts Mib1 function without disrupting its ability to interact with Notch ligands (ZHANG *et al.* 2007). Ectopic expression of Mib1^{C1205S} with the UAS-GAL4 system in *Drosophila* wing discs, where endogenous Mib1 is required, partially blocks Notch signaling, wing margin specification and wing growth (Figure 1, B). This Mib1^{C1205S}-induced phenotype is a partial inhibition of Notch signaling compared to the one seen in a total loss of *mib1* activity (Figure 1, C), and is easily visible and “scorable” by the size of the wing and the length of the wing margin. It is not suppressed by ectopic expression of the anti-apoptotic protein p35 (Figure 1, F) showing that apoptosis is not responsible for the nicks seen in adult fly wing. But it is suppressed by the overexpression of wild-type Mib1 (Figure 1, D), and ectopic expression of the activated form of Notch, NICD (Figure 1; E). These data indicate that Mib1^{C1205S} interferes in a dominant-negative manner with the activity of endogenous Mib1.

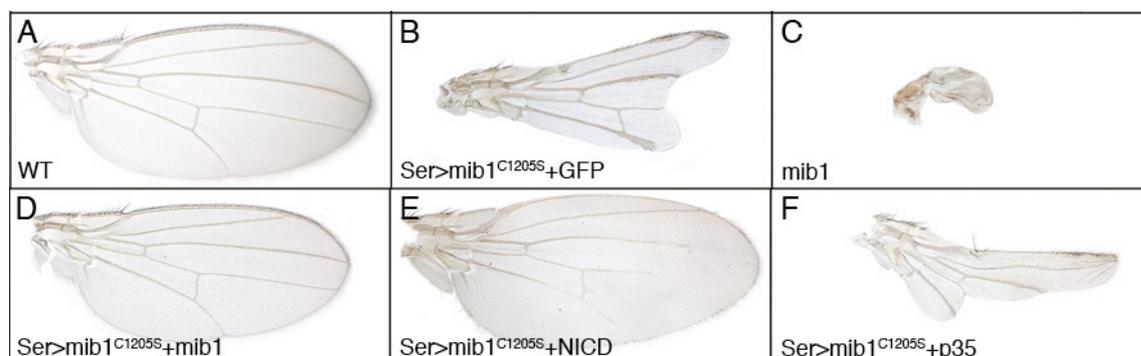


Figure 1: Overexpression of Mib1^{C1205S} specifically in the wing interferes with endogenous Mib1 in a dominant negative manner and block Notch signaling

A: wild-type control. Notch activation in the wing results in wing margin specification and wing growth.

B: expression of Mib1^{C1205S} in *UAS-GFP/ UAS-mib1^{C1205S}; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + GFP) led to defective wing margin specification and reduced growth of the wing pouch.

C: transheterozygous *mib1²/mib1³* mutant flies showed a strong wing loss phenotype, with no wing margin and wing pouch due to an absence of Notch signalization.

D: overexpression of wild-type Mib1 suppressed the Mib1^{C1205S} induced phenotype in *UAS-mib1/ UAS-mib1^{C1205S}; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + mib1). Wing margin and wing pouch growth were totally rescued.

E: overexpression of the activated form of Notch, NICD, suppressed the Mib1^{C1205S} induced phenotype in *UAS-NICD/ UAS-mib1^{C1205S}; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + NICD). Wing margin and wing pouch growth were totally rescued and veins were lost in the Ser-Gal4 pattern expression due to the overactivation of Notch signaling

F: overexpression of the anti-apoptotic protein p35 did not modify the Mib1^{C1205S} induced phenotype in *UAS-mib1^{C1205S}/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/UAS-p35* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + p35).

We also investigated the effect of Mib1^{C1205S} expression on the subcellular distribution of DI and Ser and on DI endocytosis. Overexpression of Mib1^{C1205S} in the wing imaginal disc resulted in abnormal accumulation of DI and Ser in large apical dots at the cell surface, but did not disrupt the subcellular localization of other apical markers that co-localized with DI and Ser, like Patj, Crb or E-Cad, suggesting that this mislocalization is specific for Mib1 substrates (not shown, S.H., J.F and F. S. JCB Figure 3 and S1). The endocytosis of DI was then monitored in the wing imaginal disc using an antibody uptake assay. In wild type discs, internalized DI was detected in all cells expressing DI whereas expression of Mib1^{C1205S} in dorsal cells, using Ser-GAL4, strongly inhibited DI endocytosis (not shown, S.H., J.F and F. S. JCB Figure 5). These observations are consistent with the expected molecular properties of Mib1^{C1205S} which is predicted to interact with the intracellular part of DI and Ser and to partially block them at the plasma membrane upon inhibition of their endocytosis.

A gain-of-function screen to identify suppressors of Mib1^{C1205S}-induced phenotype in the wing

The Mib1^{C1205S} dominant-negative phenotype constituted a sensitized genetic background for *mib1* activity and DSL signaling and trafficking. We used this background to select genes that suppress this phenotype when they are co-expressed with Mib1^{C1205S} in the wing imaginal disc. This gain-of-function approach has the advantage to allow the identification of gene that could be missed in a loss-of-function approach because of a functional redundancy.

The design of the screen is outlined in Figure 2. First the *Ser-GAL4* line expresses the yeast GAL4 transactivator specifically in the wing where *mib1* is expressed and required. GAL4 specifically recognizes upstream activating sequence (UAS) (BRAND and PERRIMON 1993) and activates expression of *mib1*^{C1205S}. The ubiquitously expressed thermosensitive GAL80 allows the temporal control of *mib1*^{C1205S} expression. Indeed, at a permissive temperature (25°C) GAL80 inhibits GAL4 transcription activity and *mib1*^{C1205S} expression. The *Ser>mib1*^{C1205S} line is crossed to a panel of “target” Gene Search (GS) lines (BIER 2000; BRAND and PERRIMON 1993; TOBA *et al.* 1999), each carrying a single P-element inserted at a random position in the genome. The GS-element contains UAS sequences adjacent to the core promoter from the Hsp70Bb gene at one end (GSV2, GSV7) or at both end (GSV1, GSV6) of the GS-element and orientated outward to direct transcription of genes located around the insertion point. Thus, upon GAL4 activation the GS-elements integrated into the genome will induce transcription toward the flanking DNA on one or both sides of their integration site. An insertion upstream of the protein-coding region is predicted to cause ectopic expression of the gene, while an insertion downstream of the protein-coding region is predicted to produce antisense RNA which may interfere with translation of the endogenous mRNA, and an insertion inside the gene can do both.

4180 GS insertion lines have been screened for suppression of the Mib1^{C1205S}-induced phenotype. The effect on Mib1^{C1205S}-induced phenotype can be scored in the female progeny, while phenotypes due to over- or misexpression of the gene(s) adjacent to the GS-element can be scored in male progeny (Figure 2, see material and methods for crosses information).

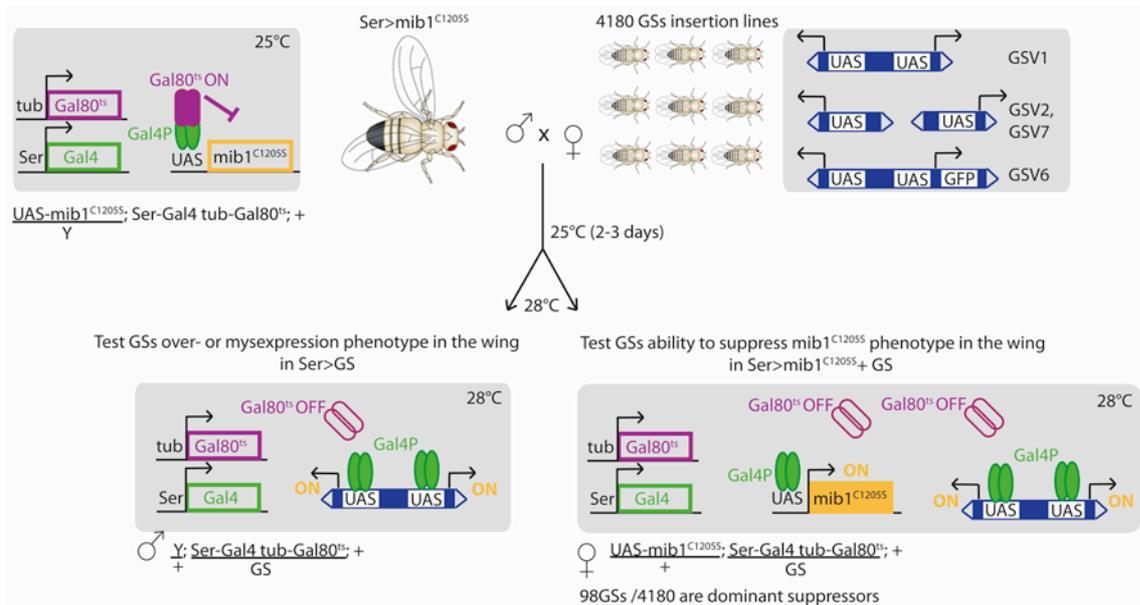


Figure 2: A gain-of-function screen in the wing to isolate suppressors of the *Mib1^{C1205S}* induced phenotype

The Ser-Gal4 driver is used in combination with the ubiquitous thermosensitive Gal80 to control the spatiotemporal expression of the different promoters downstream UAS sequences (represented by arrows) specifically in the wing since L2 / early L3 larval stages.

The screen consisted in one cross between *UAS-mib1^{C1205S}/Y; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}* males and females from 4180 GS stocks carrying a random *GS-element* insertion in the genome. The *GS-elements* contains UAS adjacent to a promoter at one end of the P-element for GSV2 and GSV7, and at both ends of GSV1 and GSV6. These promoters are orientated outward to direct transcription of genes located around the insertion point. These crosses were done at 25°C, the permissive temperature, for 2-3 days to allow the inhibition of Gal4 activity by Gal80^{ts} during embryonic, first and second instar larval stages. Progeny was then passed at 28°C to inactivate Gal80^{ts} and allowed Gal4 transcriptional activation of *UAS-mib1^{C1205S}* and the *GS-element*. The potential phenotype of GS activation is seen in the adult male progeny and the effect on *Mib1^{C1205S}*-induced phenotype is seen in the female progeny of the same cross.

GS lines suppressing significantly the *Mib1^{C1205S}*-induced phenotype were selected.

The screen allowed the isolation of 98 dominant suppressors of Mib1^{C1205S}-induced phenotype in the wing

98 GS lines over 4180 were selected as dominant suppressors of Mib1^{C1205S} phenotype in the wing corresponding to 2.3% of the GS lines screened. Figure 3A gives the list of these GS lines, with their cytological and nucleotidic mapping, the corresponding GS vector, and the two closest genes in respect with promoters orientation (see Gene Search web site to visualize GS insertion point). That corresponds to 127 candidate genes, 10 of them being associated with at least 2 different GSs. Among these 127 genes, 41 don't have any molecular Gene Ontology (GO) annotation. To test if some molecular GO are overrepresented, we calculated the ratio for each GO, between its number of apparition in the screen list and its number of apparition in the genome (Figure 3B, see material and methods for details). For instance, 18% of the Arf GTPase activator, Arf GTPase being crucial regulator of membrane traffic and dynamic but also in rearrangement of actin cytoskeleton are found in the gene list. Thus the overrepresented molecular GO are consistent with the known Mib1 function in ubiquitination and endocytosis.

A

GS number	vector	cytological map	nucleotide map	2 closest genes
1141	GSV1	X-2B14	1755496	Arm
7459	GSV2	X-3E7	3589891	CG12462 CG32781
7375	GSV2	X-6C12	6601798	CG14438
9105	GSV6	X-7D5	7901985	fs(1)h mys
1147	GSV1	X-7D5	7906201	fs(1)h mys
1120	GSV1	X-18F4	19700066	CG15618 CG32529
1166	GSV1	X-19A2	19721059	amn CG32529
3041	GSV6	2R-42A14	1752892	Pld
78	GSV1	2R-43D7	3078656	CG2093 boca
12443	GSV6	2R-49B12	8186112	nemy CG8776
10416	GSV6	2R-46E1	5590106	egr
8022	GSV3	2R-47A7	5929014	CG12897 CG33475
11852	GSV6	2R-47C1	6322086	CG12340
12655	GSV6	2R-50E6	9770906	CG8531 Hsc70-5
9962	GSV6	2R-51B6	10118941	tra2
2145	GSV1	2R-52D11	11516125	ATPCL CG8370
13499	GSV6	2R-52D11	11515169	ATPCL
13260	GSV6	2R-54B10	12936775	l(2)k01209
11860	GSV6	2R-57A6	16099327	mir-312 mir-313
36	GSV1	2R-57C7	16678616	CG4279 Xpd
12086	GSV6	2R-58E5	18021746	px
12329	GSV6	2R-58E5	18021731	px
13180	GSV6	2R-59F1	19088396	apt
11318	GSV6	2L-21E2	851044	drongo CG4291
13188	GSV6	2L-22E1	2364722	Rab5
2078	GSV1	2L-23C4	3023225	α 4GT1 CG3542

11881	GSV6	2L-23D3	3152273	Mad
2026	GSV1	2L-23D2	3144821	CG12400 toc
12463	GSV6	2L-25C1	5011087	CG31917 CG3887
2751	GSV6	2L-25F5	5800232	CG14005 CG9171
9271	?	2L-26D6	?	Sec61 α
11345	GSV6	2L-26D7	6477002	CG9536 Sec61 α
2089	GSV1	2L-27F4	7423834	chm mir-305
9868	GSV6	2L-29A5	8338238	CG14275 CG14274
11635	GSV6	2L-29C3	8416590	Akap200
10040	GSV6	2L-30E4	9912514	Srp54 CG5899
11369	GSV6	2L-31A2	10057053	Pen
12202	GSV6	2L-32C5	11001465	aub
12349	GSV6	2L-35F11	16321809	cact
9715	GSV6	2L-36A10	16681289	grp
7194	GSV2	2L-38D2	20644043	CG2478 CG2614
22994	GSV7	2L-26B3	6047912	CG12393 kisir
13248	GSV6	2L_60B5	19541197	Chip
13211	GSV6	3R-82D3	565467	tacc
12474	GSV6	3R-83B4	1425466	eIF-5C
12971	GSV6	3R-84E8	3853329	CG2747
12375	GSV6	3R-85A10	4573423	CG8223 CG9801
11668	GSV6	3R-85C3	4860170	neur
24	GSV1	3R-85C3	4859896	neur
15585	GSV6	3R-85C3	4865149	neur CG11990
11585	GSV6	3R-85D24	5376521	mura
7314	GSV2	3R-85D25	5403778	CG8273 Kap- α 3

11403	GSV6	3R-85F1	5754203	CG32469					
11364	GSV6	3R-85F9	5910216	mir-317					
9185	GSV6	3R-88D6	10727240	RpS5b					
9754	GSV6	3R-88D6	10719712	CG7265					
13030	?	3R-88E5	11075622	CG6499 CG4285					
3004	GSV1	3R-89E12	12903835	Keap1					
13076	GSV6	3R-89E10	12868828	CG3995 CG5208					
12136	GSV6	3R-90D1	13769800	cpo					
11327	GSV6	3R-91C5	14569276	Mekk1					
12332	GSV6	3R-91F7	14982454	CG11779					
10100	GSV6	3R-94E8	19074767	CG4449					
9710	GSV6	3R-94E13	19172141	pnt					
11287	GSV6	3R-95D8	19857095	CG5405					
12677	GSV6	3R-95D8	19857157	CG5405					
9610	GSV6	3R-95E1	19931129	Syx1A CG33100					
12953	GSV6	3R-96A23	20642708	CG5808 CG6995					
13139	GSV6	3R-96B19	20876132	CG11791					
9835	GSV6	3R-96C1	20950320	CG11844					
11828	GSV6	3R-96C1	20948610	CG11844 CG31108					
12408	GSV6	3R-96C8	21070835	bam					
9325	GSV6	3R-98A7	23407078	wdb					
12285	GSV6	3R-98F2	24717499	Doa					
11447	GSV6	3R-98F6	24888686	cul-5					
9997	GSV6	3R-99E1	26000282	Mlc2					
11602	GSV6	3R-100B1	26879583	I(3)03670					
7058	GSV2	3L-61C8	683318	CG13894 CG3279					
11937	GSV6	3L-61E2	991502	trio					
12485	GSV6	3L-61E2	1018393	trio CG9205					
12796	GSV6	3L-63F1	3794782	CG12006					
13069	GSV6	3L-65A8	6167074	CG13298 Trn					
9450	GSV6	3L-65D5	6938662	sgl					
12841	GSV6	3L-72D1	16012166	th					
13242	GSV6	3L-74D2	17479647	CG6322 CG7564					
3083	GSV1	3L-76B9	19598512	CG8789					
11202	GSV6	3L-67F3	10872940	CG6391					
11597	GSV6	3L-77C6	20454914	CG5047 CG5104					
10070	GSV6	3L-78A5	20968397	CG10581 loner					
11317	GSV6	3L-78C2	21109896	chb					
12470	?	3L-79F4	?	CG14457 CG14458					
12418	GSV6	3L-80A1	22661893	CG11367 CG14450					
3294	GSV1	3L-79F6	22651023	CG6838					
11570	GSV6	3L-100D1	27550464	ttk					
11872	GSV6	3L-100D2	27602788	faf CG2126					
11810	GSV6	3L-100D1	27550903	ttk					
12377	GSV6	3L-100D2	27638265	Ferro- chelataase					
9020	GSV6	3L-100E3	27878342	mod krz					
84	GSV1	3L-102C2	578172	Pur-alpha					

B

GO number	screen/genome	GO
GO:0017058	2/2 1	FH1 domain binding
GO:0008060	2/11 0.181	ARF GTPase activator activity
GO:0008565	6/52 0.115	protein transporter activity
GO:0016566	2/32 0.062	specific transcriptional repressor activity
GO:0015450	2/35 0.057	protein translocase activity
GO:0000166	7/155 0.045	nucleotide binding
GO:0005484	2/45 0.044	SNAP receptor activity
GO:0004672	6/140 0.043	protein kinase activity
GO:0003729	8/271 0.029	mRNA binding
GO:0008017	2/72 0.027	microtubule binding
GO:0004722	2/82 0.024	protein serine/threonine phosphatase activity
GO:0004842	2/108 0.018	ubiquitin-protein ligase activity
GO:0005524	13/714 0.018	ATP binding
GO:0003674	5/1846 0.018	Molecular function
GO:0003676	7/380 0.018	nucleic acid binding
GO:0003702	2/114 0.017	RNA polymerase II transcription factor activity
GO:0003723	2/125 0.016	RNA binding
GO:0005515	18/1112 0.016	protein binding
GO:0003677	10/657 0.015	DNA binding
GO:0043565	3/195 0.015	Sequence specific DNA binding
GO:0004674	5/351 0.014	protein serine/threonine kinase activity
GO:0008270	9/843 0.011	zinc ion binding
GO:0005488	3/355 0.008	binding
GO:0005525	2/208 0.009	GTP binding
GO:0003700	3/454 0.006	transcription factor activity
TOTAL	202/65532 0.003	

Figure 3: List of GSs lines suppressing significantly the *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype in the wing and Gene Ontology analysis

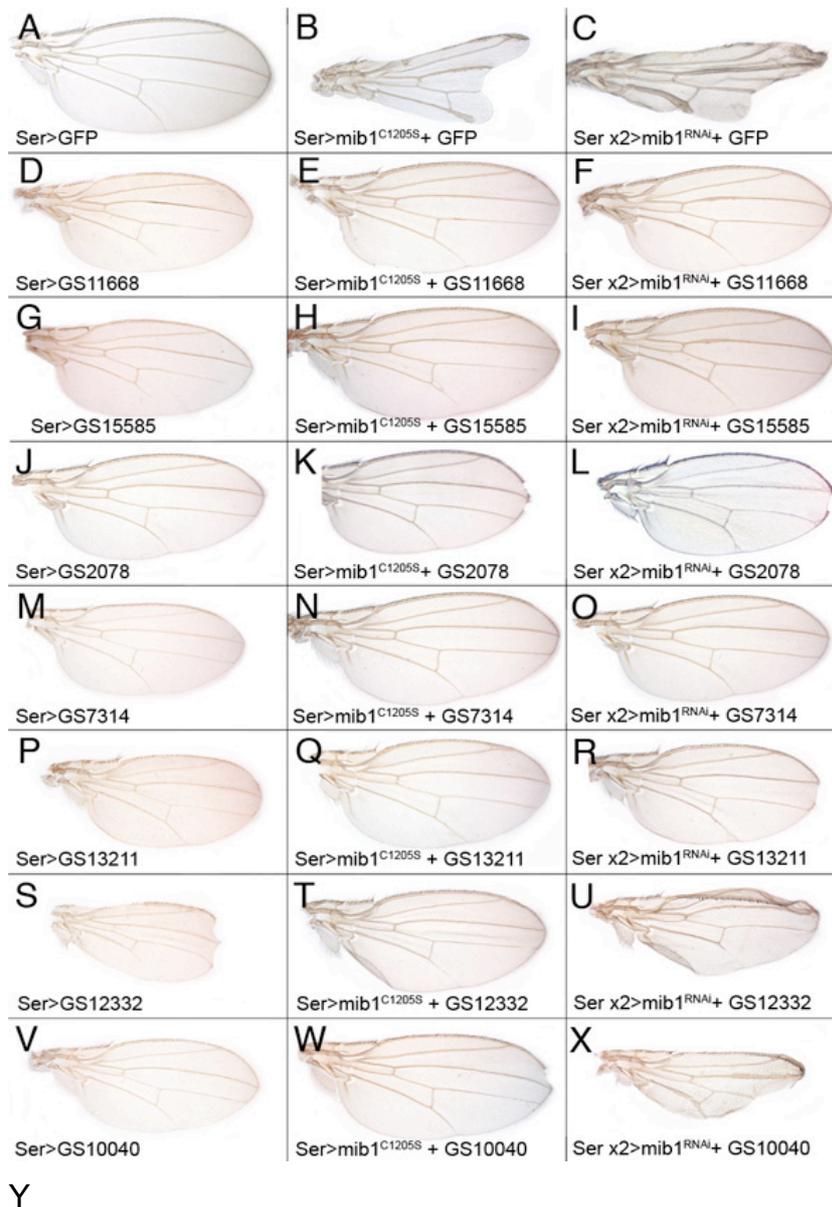
A: The 98 GS lines significantly suppressing the *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype are presented in a table with their GS identification number, their cytological and nucleotidic localization and the two closest genes in a 10kb window and in respect with promoters orientation. The GSs in red also modified *mib1*^{RNAi} phenotype in the wing.

B: These 98 GS lines correspond to a list of 127 genes. 87 of them have at least one molecular GO annotation in flybase, and the list of GOs found more than once in the screen is presented in the table B. To quantify the representation of each GO in the screen, we calculated the ratio between the number of GO apparition in the screen over the number of GO apparition in the genome. GO are ordered in increased over-representation, a random apparition in the screen corresponds to 0,3% of the apparition number in the genome.

To test if some molecular GO are overrepresented, we calculated the ratio for each GO, between its number of apparition in the gene list and its number of apparition in the genome (Figure 3B, see material and methods for details).

Selection of 7 GS lines suppressing both $Mib1^{C1205S}$ and $mib1^{RNAi}$ -induced phenotypes in the wing

To confirm the ability of these 98 dominant suppressors of $Mib1^{C1205S}$ to interact genetically with *mib1*, we used the downregulation of endogenous *mib1* expression by RNAi in the wing as a different context of *mib1* partial loss of activity. Indeed, expression of $mib1^{RNAi}$ in the wing driven by two copies of Ser-GAL4 (noted Ser x2> $mib1^{RNAi}$ in Figure 4) blocks the signaling activity of Notch ligand and induces a defect in wing margin specification (Figure 4, C) similar to the one induced by $Mib1^{C1205S}$ overexpression (Figure 4, B). To identify potential positive regulators of ligand trafficking and signaling activity, we tested these 98 dominant suppressors of $Mib1^{C1205S}$ on the phenotype induced by $mib1^{RNAi}$. We selected 7 GS lines suppressing both the overexpression of the dominant-negative $Mib1^{C1205S}$ and the decrease of *mib1* endogenous expression by RNAi (Figure 4, D-X, Y). These GS lines potentially activate positive regulators of Notch signaling, at the level of ligand endocytosis or downstream this step.



GS number	vector	cytological map	nucleotide map	2 closest genes
11668	GSV6	3R-85C3	4860170	neur
15585	GSV6	3R-85C3	4865149	neur CG11990
2078	GSV1	2L-23C4	3023225	α 4GT1 CG3542
7314	GSV2	3R-85D25	5403778	CG8273 Kap- α 3
13211	GSV6	3R-82D3	565467	tacc
12332	GSV6	3R-91F7	14982454	CG11779
10040	GSV6	2L-30E4	9912514	Srp54 CG5899

Figure 4: Isolation of 7 GS lines suppressing both *Mib1*^{C1205S} and *mib1*^{RNAi} phenotype in the wing

A: wild-type wing.

B: expression of *Mib1*^{C1205S} in *UAS-GFP/ UAS-mib1*^{C1205S}; *Ser-Gal4 tub-Gal80*^{ts/+} flies (noted *Ser>mib1*^{C1205S}+ GFP) leads to defective wing margin specification and reduced growth of the wing pouch.

C: strong inactivation of *mib1* expression by RNAi in *UAS-GFP/+; Ser-Gal4 Ser-Gal4 UAS-mib1*^{RNAi} *Ser-Gal4 tub-Gal80*^{ts/+} flies (noted *Ser x2>mib1*^{RNAi}+ GFP) leads to defective wing margin specification and reduced growth of the wing pouch.

D-F: Activation of GS11668 in the wing induces partial loss of vein (D) ; suppresses *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (E) and *mib1*^{RNAi}-phenotype (F).

G-I: Activation of GS15585 in the wing induces partial loss of vein (G) ; suppressed *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (H) and *mib1*^{RNAi}-phenotype (I).

J-L : Activation of GS2078 in the wing does not show any detectable phenotype (J) ; but suppresses *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (K) and *mib1*^{RNAi}-phenotype (L).

M-O : Activation of GS7314 in the wing does not show any detectable phenotype (M) ; suppresses *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (N) and *mib1*^{RNAi}-phenotype (O).

P-R : Activation of GS13211 in the wing does not show any detectable phenotype (P) ; suppresses *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (Q) and *mib1*^{RNAi}-phenotype (R).

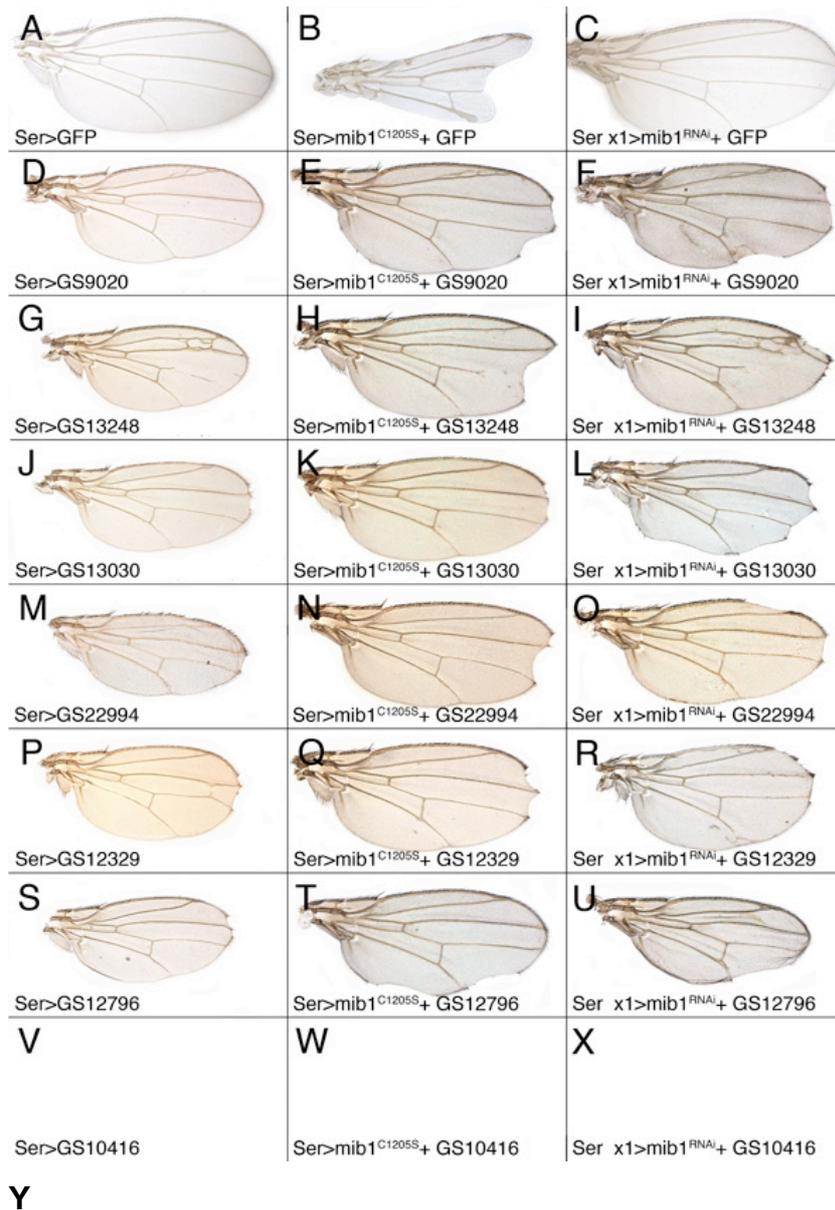
S-U : Activation of GS12332 in the wing induces a loss of wing margin specification (S) ; suppresses *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (T) and *mib1*^{RNAi}-phenotype (U).

V-X: Activation of GS10040 in the wing does not show any detectable phenotype (V) ; suppresses *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype (W) and suppressed partially *mib1*^{RNAi}-phenotype (X).

Y: This table summarizes these 7 GS lines, with their GS identification number, their cytological and nucleotidic localization and the two closest genes in a 10kb window and in respect with promoters orientation.

Selection of 7 GS lines suppressing Mib1^{C1205S}-induced phenotype and enhancing *mib1*^{RNAi}-induced phenotype

Then, to identify potential negative regulators of Mib1 among the 98 dominant suppressors of Mib1^{C1205S}, we screened for GS lines enhancing *mib1*^{RNAi}-induced phenotype in the wing. The negative regulators of Mib1 should rescue the Mib1^{C1205S} phenotype by inactivating the dominant-negative Mib1^{C1205S} and rebalancing the competition between endogenous Mib1 and overexpressed Mib1^{C1205S}. And they should enhance the *mib1*^{RNAi}-induced phenotype by inhibiting the endogenous Mib1. To facilitate the observation of *mib1*^{RNAi} enhancers, we used a line that overexpresses *mib1*^{RNAi} at a low level (with only one copy of Ser-GAL4, noted Ser x1>*mib1*^{RNAi} in Figure 5) and does not show any wing margin phenotype at 28°C in a wild type background (Figure 5, C). Among the 98 dominant suppressors of Mib1^{C1205S}, 7 GS lines enhance the phenotype of *mib1*^{RNAi} and/or show a wing nick phenotype by the only GS activation in the wing (Figure 5, D-X, Y).



GS number	vector	cytological map	nucleotide map	2 closest genes
9020	GSV6	3L-100E3	27878342	mod krz
13248	GSV6	2L_60B5	19541197	Chip
13030	?	3R-88E5	11075622	CG6499 CG4285
22994	GSV7	2L-26B3	6047912	CG12393 kisir
12329	GSV6	2R-58E5	18021731	px
12796	GSV6	3L-63F1	3794782	CG12006
10416	GSV6	2R-46E1	5590106	egr

Figure 5: Isolation of seven GS lines that suppressed $mib1^{C1205S}$ and enhanced $mib1^{RNAi}$ phenotype and/or induce wing nick by GS activation alone

A: wild-type wing.
 B: Mib1^{C1205}-induced phenotype in the wing.
 C: weak inactivation of *mib1* expression by RNAi in *UAS-GFP/+; Ser-Gal4 UAS-mib1^{RNAi} tub-Gal80^{ts/+}* flies (noted Ser x1>mib1^{RNAi}+ GFP) did not show any detectable phenotype.
 D-F: GS9020 (*Kurtz* ?). Activation of GS9020 in the wing induced a defect in vein patterning (D) ; GS9020 suppressed Mib1^{C1205S}-induced phenotype (E) and induced wing notches in the mib1^{RNAi}-background (F).
 G-I: GS13248 (*Chip* ?). Activation of GS13248 in the wing induced a defect in vein patterning (G) ; GS13248 suppressed Mib1^{C1205S}-induced phenotype (H) and induced wing notches in the mib1^{RNAi}-background (I).
 J-L : GS13030 (*Hsc70-4* ?). Activation of GS13030 in the wing induced little wing notches (J) ; GS13030 suppressed Mib1^{C1205S}-induced phenotype (K) and induced wing notches in the mib1^{RNAi}-background (L) enhanced compared to the wild-type background (L compared to J).
 M-O : GS22994. Activation of GS22994 in the wing induced little wing notches (M) ; GS22994 suppressed Mib1^{C1205S}-induced phenotype (N) and induced wing notches in the mib1^{RNAi}-background (O).
 P-R : GS12329 (*px* ?). Activation of GS12329 in the wing induced little wing notches (P) ; GS12329 suppressed Mib1^{C1205S}-induced phenotype (Q) and induced wing notches in the mib1^{RNAi}-background (R).
 S-U : GS12796. Activation of GS12796 in the wing induced little wing notches (S) ; GS12796 suppressed Mib1^{C1205S}-induced phenotype (T) and induced wing notches in the mib1^{RNAi}-background (U).
 V-X: GS10416 (interaction not shown).

Identification of *neuralized*, *α4GT1* and *Hsc70-4* as genetic interactor of *mib1*

The positions in the genome of the 14 GS lines suppressing the Mib1^{C1205S} phenotype and modifying by suppression or enhancement the *mib1*^{RNAi} phenotype, were checked by PCR and remapped if necessary (see material and methods, and Figures 4, Y and Figure 5, Y). Most of these lines (11/14) correspond to bidirectional GSs and can activate several candidate genes. The gene responsible for the genetic interaction with *mib1* has to be identified in each case and to be tested for its regulatory function in DSL signaling and trafficking. For 4 GSs among the 14 selected, the gene responsible for the genetic interaction with *mib1* has been identified.

Two GS lines suppressing both Mib1^{C1205S} and *mib1*^{RNAi} phenotypes correspond to insertions close to *neur*. GS11668 is in the *neur* first intron and GS15585 is in its 5'UTR. Activation of these GSs in the wing, in a wild type context, induced a loss of vein phenotype (Figure 4, D and G) similar to the one seen in *neur* (not shown) or NICD ectopic expression (Figure 1, E) and attributed to ectopic activation of Notch signaling (DE CELIS 2003) (BIER 2000). To test if *neur* ectopic expression was sufficient for the suppression of Mib1^{C1205S} and *mib1*^{RNAi} phenotypes we specifically co-expressed *neur* cDNA with Mib1^{C1205S} and *mib1*^{RNAi}, and concluded that *neur* was able to compensate for these loss of *mib1* activity. Neur is another E3 ubiquitine ligase distinct from Mib1, and required for Notch ligand activity and trafficking but in different subsets of Notch signaling events. The overlapping molecular activities of Mib1 and Neur have already been shown (LE BORGNE *et al.* 2005b), but this result constitutes a positive control for the screen. It confirms that the GS elements allow the overexpression of genes located close to their insertion point and allow the identification of regulators of ligand trafficking.

The GS2078 has been shown to suppress both Mib1^{C1205S} and *mib1*^{RNAi} through the overexpression of *α4GT1*, *α4GT1* expression being both required and sufficient for the restoration of Notch signaling in these contexts (S. Hamel, J. Fantini and F. Schweisguth, JCB 2010). Expression of *α4GT1* suppresses the signaling and endocytosis defects of DI and Ser resulting from the inhibition of *mib1* and/or *neur* activity. *α4GT1*, coding the α1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase1, plays a regulatory but non-essential function in Notch signaling via the synthesis of a specific

glycosphingolipid (GSL), N5, produced by $\alpha 4GT1$. The identification of a conserved GSL binding motif in the extracellular part of the DSL suggests that a direct ligand/GSLs interaction underly $\alpha 4GT1$ activity in Notch signaling. Changes of GSLs composition at the plasma membrane by $\alpha 4GT1$ overexpression could modify the distribution and the organization of lipids and of specific cargoes, including DI and Ser, facilitating their endocytosis, hence signaling activity.

GS13030 activation suppresses $Mib1^{C1205S}$ phenotype and enhanced $mib1^{RNAi}$ phenotype. Three CGs are found in a 10kb window around the GS insertion site. When expression of one of these genes, *Hsc70-4*, is blocked by RNAi, GS13030 is not anymore able to rescue the $Mib1^{C1205S}$ phenotype (Figure 6, compare E with A), meaning that expression of endogenous *Hsc70-4* is required for the rescue of Notch signaling and that overexpression of *Hsc70-4* is responsible for the interaction with *mib1*. Hsc70-4 is a chaperon protein with an ATPase activity and is known to uncoat clathrin-coated vesicles (CCVs) *in vivo*. It has already been identified as a genetic interactor of the hypomorphic *notch* allele *notchoïd* (HING *et al.* 1999), and *auxilin*, one of its cofactor, is known to be required for DSL internalization and activation (EUN *et al.* 2008) (KANDACHAR *et al.* 2008). But the direct involvement of Hsc70-4 in the regulation of DSL trafficking and signaling activity has not been addressed yet.

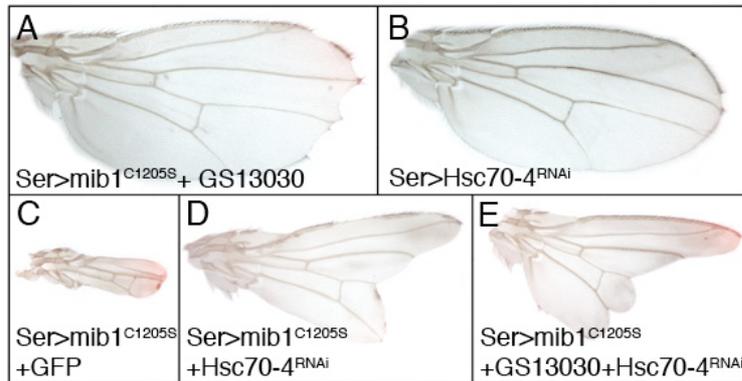


Figure 6: Ectopic expression *Hsc70-4* is required for the rescue of *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype by GS13030

A: activation of GS13030 suppressed the *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype in *UAS-mib1*^{C1205S}; *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/GS13030* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + GS13030).

B: down regulation of *Hsc70-4* by RNAi (ID26465) in the wing induced little notches in *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+; ID26465/+* flies (noted Ser>Hsc70-4^{RNAi}).

C: *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype in *UAS-mib1*^{C1205S}; *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/UAS-GFP* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + GFP).

D: down regulation of *Hsc70-4* by RNAi (ID26465) does not rescue the *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype in *UAS-mib1*^{C1205S}; *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+; ID26465/+* flies (noted Ser>mib1^{C1205S}+Hsc70-4^{RNAi}).

E: down regulation of *Hsc70-4* expression by RNAi (ID26465) blocked the suppression of *Mib1*^{C1205S}-induced phenotype by GS13030 in *UAS-mib1*^{C1205S}; *Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/GS13030; ID26465/+* flies (noted Ser>mib1^{C1205S} + GS13030 + Hsc70-4^{RNAi}).

DISCUSSION

We chose an open genetic approach to identify genes interacting in gain-of-function with *mib1*. Overexpression of the dominant-negative Mib1^{C1205S} in the wing interferes with endogenous Mib1 and blocks DSL activity and trafficking, Notch signaling and wing margin specification. We used this context as a sensitized background for DSL activity to select in a primary screen, dominant suppressors of this phenotype. We screened 4180 random GS insertion lines that induce transcription toward the flanking DNA of their insertion site in the genome and selected 98 dominant suppressors of Mib1^{C1205S}-induced phenotype. Among these 98 lines, 7 also suppressed the phenotype induced by a down-regulation of endogenous *mib1* expression by RNAi and could correspond to positive regulators of *mib1*-dependant DSL signaling. And 7 enhanced the *mib1*^{RNAi} phenotypes and / or show wing nick phenotype upon GS induction in the wing, and could correspond to negative regulators of Mib1.

These GS-elements integrated into the genome induce transcription toward the flanking DNA on both sides of their integration site and could cause ectopic expression of genes in the promoter orientation and RNA interference of the expression of genes in the reverse orientation. We showed that ectopic expression of *neuralized*, the other ubiquitin ligase involved DSL signaling, *α4GT1* a glycosyltransferase showed to modulate glycosphingolipid composition and Notch ligand activity, and *Hsc70-4* involved in clathrin coat dynamic are responsible for the interaction of GS11669 and GS15585, GS2078 and GS13030 with the dominant negative Mib1^{C1205S}. The genes responsible for the interaction between *mib1* and the other 10 GS-elements remain to be identified by testing the sufficiency and the requirement of candidate genes expression for the rescue by these GS elements. However, some genes, because they show a Notch like phenotype in loss-of-function like the β-arrestin *Kurtz* already involved in Notch activity down regulation (GS9020), or *Kap-α3*, a regulator of nuclear import (GS7314) are good candidates for the interaction with *mib1*.

Hsc70-4 is a chaperon protein with an ATPase activity and is known to uncoat clathrin-coated vesicles (CCVs) *in vivo*, which allows fusion with targeted endosomes (EISENBERG and GREENE 2007). Hsc70-4 also catalyzes rearrangement of the clathrin coat during vesicles invagination, constriction and scission, and chaperons clathrin after its dissociation from CCV so that it does not aggregate in the cytosol and can be recycled (EISENBERG and GREENE 2007). Hsc70-4 cooperates with its cofactors with J domain: Auxilin and cyclin G associated kinase (GAK) (UNGEWICKELL *et al.* 1995), and *auxilin* is known to be required for DSL internalization and activation (EUN *et al.* 2008) (KANDACHAR *et al.* 2008) at least in part by recycling clathrin pool. *Drosophila* has five *Hsc70* genes constitutively expressed Hsc70-4 being the most abundantly produced, and two of them, *Hsc70-4* (GS13030) and *Hsc70-5* (GS12655), are found in the list of genes potentially misexpressed by GSs suppressing Mib1^{C1205S} phenotype (Figure 3A). The function of Hcs70 family gene in Mib1 activity and in DSL trafficking and signaling in *Drosophila* remains to be analysed but overexpression of Hsc70-4 could chaperon free clathrin preventing the formation of clathrin coated pits and efficient DSL endocytosis.

REFERENCES

- BARDIN, A. J., and F. SCHWEISGUTH, 2006 Bearded family members inhibit Neutralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in *Drosophila*. *Dev Cell* **10**: 245-255.
- BIER, E., 2000 Drawing lines in the *Drosophila* wing: initiation of wing vein development. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 393-398.
- BRAND, A. H., and N. PERRIMON, 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
- BRAY, S. J., 2006 Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 678-689.
- D'SOUZA, B., A. MIYAMOTO and G. WEINMASTER, 2008 The many facets of Notch ligands. *Oncogene* **27**: 5148-5167.
- DE CELIS, J. F., 2003 Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**: 443-451.
- EISENBERG, E., and L. E. GREENE, 2007 Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* **8**: 640-646.
- EUN, S. H., S. M. BANKS and J. A. FISCHER, 2008 Auxilin is essential for Delta signaling. *Development* **135**: 1089-1095.
- FORTINI, M. E., 2009 Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* **16**: 633-647.
- HAGEDORN, E. J., J. L. BAYRAKTAR, V. R. KANDACHAR, T. BAI, D. M. ENGLERT *et al.*, 2006 *Drosophila melanogaster* auxilin regulates the internalization of Delta to control activity of the Notch signaling pathway. *J Cell Biol* **173**: 443-452.
- HARPER, J. A., J. S. YUAN, J. B. TAN, I. VISAN and C. J. GUIDOS, 2003 Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* **64**: 461-472.
- HING, H. K., L. BANGALORE, X. SUN and S. ARTAVANIS-TSAKONAS, 1999 Mutations in the heatshock cognate 70 protein (hsc4) modulate Notch signaling. *Eur J Cell Biol* **78**: 690-697.
- ITOH, M., C. H. KIM, G. PALARDY, T. ODA, Y. J. JIANG *et al.*, 2003 Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* **4**: 67-82.
- KANDACHAR, V., T. BAI and H. C. CHANG, 2008 The clathrin-binding motif and the J-domain of *Drosophila* Auxilin are essential for facilitating Notch ligand endocytosis. *BMC Dev Biol* **8**: 50.
- KOPAN, R., and M. X. ILAGAN, 2009 The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**: 216-233.
- LAI, E. C., F. ROEGIERS, X. QIN, Y. N. JAN and G. M. RUBIN, 2005 The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* **132**: 2319-2332.
- LE BORGNE, R., A. BARDIN and F. SCHWEISGUTH, 2005a The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**: 1751-1762.
- LE BORGNE, R., S. REMAUD, S. HAMEL and F. SCHWEISGUTH, 2005b Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* **3**: e96.
- MUKHERJEE, A., A. VERAKSA, A. BAUER, C. ROSSE, J. CAMONIS *et al.*, 2005 Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat Cell Biol* **7**: 1191-1201.

- OVERSTREET, E., E. FITCH and J. A. FISCHER, 2004 Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* **131**: 5355-5366.
- PARKS, A. L., K. M. KLUEG, J. R. STOUT and M. A. MUSKAVITCH, 2000 Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**: 1373-1385.
- PERRIN, L., O. DEMAKOVA, L. FANTI, S. KALLENBACH, S. SAINGERY *et al.*, 1998 Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in *Drosophila*. *J Cell Sci* **111 (Pt 18)**: 2753-2761.
- ROCA, C., and R. H. ADAMS, 2007 Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev* **21**: 2511-2524.
- RORTH, P., K. SZABO, A. BAILEY, T. LAVERTY, J. REHM *et al.*, 1998 Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**: 1049-1057.
- SEUGNET, L., P. SIMPSON and M. HAENLIN, 1997 Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* **192**: 585-598.
- TOBA, G., T. OHSAKO, N. MIYATA, T. OHTSUKA, K. H. SEONG *et al.*, 1999 The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**: 725-737.
- UNGEWICKELL, E., H. UNGEWICKELL, S. E. HOLSTEIN, R. LINDNER, K. PRASAD *et al.*, 1995 Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378**: 632-635.
- WANG, W., and G. STRUHL, 2004 *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* **131**: 5367-5380.
- WANG, W., and G. STRUHL, 2005 Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**: 2883-2894.
- WENG, A. P., A. A. FERRANDO, W. LEE, J. P. T. MORRIS, L. B. SILVERMAN *et al.*, 2004 Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**: 269-271.
- ZHANG, C., Q. LI and Y. J. JIANG, 2007 Zebrafish Mib and Mib2 are mutual E3 ubiquitin ligases with common and specific delta substrates. *J Mol Biol* **366**: 1115-1128.

Annexes du chapitre 1

Les résultats présentés dans cette annexe n'ont pas été intégrés à l'article car ils n'ont pas été obtenus de façon systématique pour tous les candidats issus du crible. Ils correspondent à la recherche des gènes responsables de l'interaction génétique entre les 14 lignées GS sélectionnées et *mib1*, ainsi qu'à la sélection des candidats qui présentent un phénotype en perte de fonction potentiellement lié à la signalisation Notch.

1 Recherche des gènes responsables de l'interaction entre les 14 éléments GS et *mib1*

1.1 Établissement d'une liste de gène candidats

L'insertion d'un GS en amont d'un gène est censée induire sa transcription et son expression ectopique par la production d'ARN sens, alors qu'une insertion en aval d'un gène devrait induire la production d'ARN anti-sens qui peut interférer avec l'expression endogène de ce gène (Figure 1A). La plupart des éléments GS sélectionnés sont bidirectionnels (GSV1 et GSV6) avec des UAS et des promoteurs à la fois en 5' et en 3'. Ceci a l'avantage d'augmenter le nombre de gènes criblés, mais complique l'identification du gène responsable de l'interaction avec *mib1*, la transcription de plusieurs gènes pouvant être modifiée simultanément.

Pour faire une liste des gènes dont la transcription est modifiée de façon GAL4 dépendante par les éléments GS, il faudrait avoir une idée de la portée de l'effet activateur du GAL4. Il faudrait aussi savoir si les GS peuvent induire la transcription anti-sens d'un gène orienté dans le sens inverse des promoteurs du GS et donc éventuellement interférer avec son expression endogène. Afin de déterminer des règles générales qui régissent l'effet des GS activés par Gal4 sur leurs gènes adjacents, De Celis et al (Molnar, Lopez-Varea et al. 2006) ont réalisé des séries

d'hybridations *in situ* pour détecter l'ARN sens et anti-sens des gènes adjacents à ces éléments GS bidirectionnels (GSV1) activés dans l'aile par sal-Gal4. Ils concluent que :

i) le gène le plus proche de chaque promoteur, et orienté dans le sens du promoteur, est toujours ectopiquement transcrit (détection de l'ARN sens, 21 cas analysés, leur distance au GS n'est pas précisée).

ii) les gènes suivants, et orientés dans le sens du promoteur, ne sont pas forcément surexprimés. Plusieurs gènes peuvent être surexprimés simultanément même s'ils sont séparés du GS par un gène orienté dans le sens inverse du promoteur.

iii) la production d'ARN anti-sens n'est jamais détectée et cela quelle que soit l'orientation du gène par rapport au promoteur (6 cas analysés). Cela suggère que dans la plupart des cas, les GS induisent de la surexpression plutôt que de l'extinction par ARN interférence, mais un faible niveau de production d'ARN anti-sens sous le seuil de détection de l'hybridation *in situ* pourrait avoir un effet d'interférence.

Pour établir la liste des gènes candidats à l'interaction avec *mib1* à partir de la liste des 14 GS modifiant les phénotypes induits par *Mib1*^{C1205S} et *mib1*^{RNAi}, je n'ai considéré que les gènes orientés dans le sens des promoteurs des GS et donc uniquement les gènes potentiellement surexprimés. J'ai aussi limité les candidats aux gènes placés dans une fenêtre arbitraire (la portée du GAL4 n'étant pas connue) de 5kb pointés par chacun des promoteurs des éléments GS (ce qui fait une fenêtre de 10kb centrée sur le GS). Dans l'exemple présenté en Figure 1A, je ne considère donc que les gènes A, B et C. 11 lignées GS sur les 14 sélectionnées sont censées correspondre à des GS bidirectionnels. Le point d'insertion de chacun de ces GS a été vérifié par PCR. La nature des vecteurs et leur caractère uni/bidirectionnel des GS n'ont pas été vérifiés. En revanche, personne n'ayant testé l'effet d'un GS unidirectionnel sur l'expression des gènes de part et d'autre du point d'insertion, on ne peut pas exclure un effet bidirectionnel. J'ai donc considéré que tous les GS étaient fonctionnellement bidirectionnels. D'après ces critères, les 14 GS correspondent à une liste de 31 gènes candidats (Figure 2, A et B).

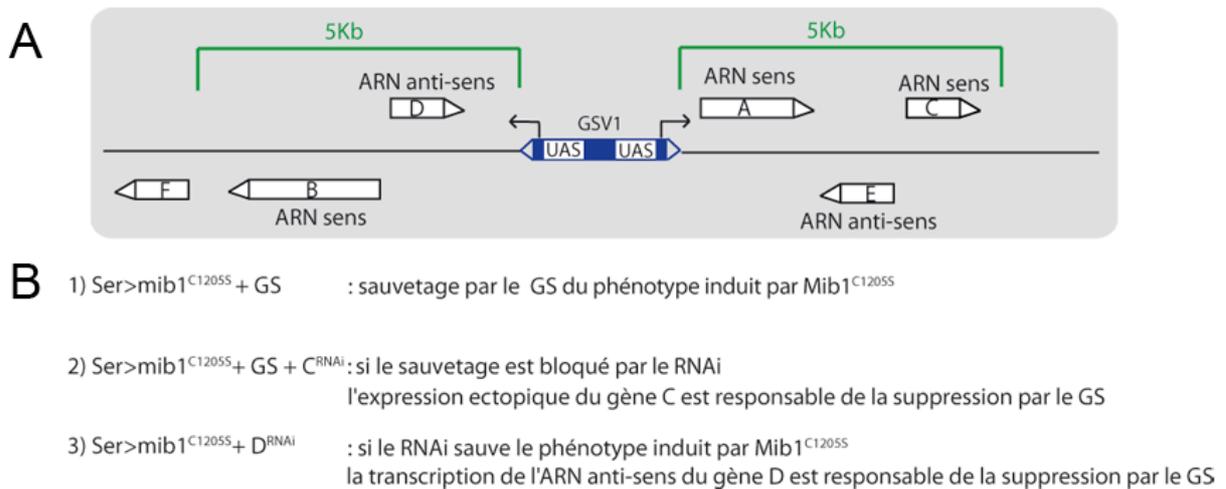


Figure 1: Représentation du point d'insertion d'un élément GS bidirectionnel fictif et de la stratégie d'identification du gène responsable du sauvetage du phénotype induit par Mib1^{C1205S}

A : Représentation du point d'insertion d'un élément GS bidirectionnel fictif (en bleu, les promoteurs étant symbolisés par des flèches). Seuls les gènes compris dans une fenêtre de 5kb de part et d'autre du site d'insertion et orientés dans le sens des promoteurs du GS sont considérés, c'est-à-dire les gènes A, B et C. Le sens de transcription des gènes est pointé par les triangles.

B : Stratégie d'identification de l'interacteur de *mib1* par RNAi. Le blocage de l'expression endogène d'un gène par RNAi permet de tester si la surexpression de ce gène est requise pour le sauvetage du phénotype *mib1*^{C1205S} par le GS (phénotype 2 à comparer avec le 1), ou si c'est l'extinction de ce gène qui est responsable du sauvetage (phénotype 3 à comparer avec le 1).

1.2 Principe de la stratégie d'identification des gènes dont la surexpression est nécessaire au sauvetage du phénotype induit par Mib1^{C1205S}

Afin d'identifier de manière systématique l'interacteur génétique de *mib1* pour chaque GS, différentes stratégies basées sur le blocage de l'expression des gènes candidats sont possibles.

La première consiste à réaliser une mutagenèse sur le chromosome portant le GS (GS*) et à sélectionner les mutations qui empêchent le sauvetage du phénotype Mib1^{C1205S} par le GS. Les différents chromosomes GS* doivent donc être

homozygotes viables, et doivent être associés à un driver et un UAS-*mib1*^{C1205S} (disponible sur différents chromosomes) pour tester le sauvetage du phénotype induit par *Mib1*^{C1205S}. Les mutations qui empêchent le sauvetage du phénotype *Mib1*^{C1205S} peuvent alors concerner la séquence du GS elle-même (mutation dans les promoteurs ou les séquences UAS), le gène dont la surexpression sauve le phénotype, un gène indépendant sur le chromosome qui aggrave le phénotype induit par *Mib1*^{C1205S}. Il faut donc ensuite analyser la séquence du GS et de sa région adjacente pour identifier cette mutation. Cette stratégie a l'avantage de produire de nouveaux allèles mutants des gènes candidats, mais elle n'a pas été choisie car elle nécessite beaucoup de temps.

La deuxième stratégie consiste à bloquer l'expression endogène des gènes candidats par RNA interférence (RNAi) et à identifier ceux dont la surexpression est nécessaire au sauvetage du phénotype *Mib1*^{C1205S} par chaque GS. Cette stratégie a été choisie car elle est beaucoup plus rapide que la première. Chaque GS a été combiné avec les lignées RNAi-GD du VDRC dirigées contre les gènes candidats correspondant. Chaque combinaison GS/RNAi, ainsi que les GS seuls et les RNAi seuls, sont testés pour leur effet sur le phénotype induit par *mib1*^{C1205S} (Figure 1, B). Si le RNAi d'un gène bloque la suppression du phénotype *mib1*^{C1205S} par le GS (Figure 1, B, cas 2), on en conclut que l'interaction de ce GS avec *mib1* est due à la surexpression de ce gène.

Les 14 GS correspondent à une liste de 31 gènes candidats potentiellement surexprimés (Figure 2). Sur ces 31 gènes, 14 gènes associés à 10 lignées GS ont pu être testés.

1.3 Résultats de l'identification des interacteurs par RNAi

Cette stratégie a permis d'identifier les interacteurs de *mib1* pour deux lignées GS. Ainsi, le GS7820 sauve le phénotype *Mib1*^{C1205S} par surexpression d' α 4GT1 comme le montre la Figure 2 E-F du papier du chapitre 2. Le GS1303 sauve le phénotype *Mib1*^{C1205S} par surexpression de la protéine Hsp70-4 comme le montre la Figure 6 du papier du crible.

Les résultats complets sont présentés dans le tableau de la Figure 2 qui suit.

17 gènes sur 31 n'ont pas été testés soit parce que leurs lignées RNAi n'ont pas été combinées avec leur GS respectif, soit parce que leurs lignées RNAi n'existaient pas.

GS (vector)	Gènes candidats	lignées RNAi testées	Réversion du sauvetage ?
11668 (GSV6)	CG11988 (neur)		ND
15585 (GSV6)	CG11988 (neur)		ND
	CG11990	ID 28317	NON
2078 (GSV1)	CG17223 (α4GT1)	ID 2608, ID 2609	OUI
	CG354		ND
13211 (GSV6)	CG9765 (tacc)		ND
7314 (GSV2)	CG8273	ID 2885, ID 2887	NON
	CG9423 (Kap- α 3)	ID 36104	NON
10040 (GSV6)	CG4602 (Srp54)		ND
	CG5899		ND
	CG4600 (yip-2)		ND
	CG13124		ND
12332 (GSV6)	CG11779	ID16309	NON
	CG5637 (nanos)	ID22693	NON
	CG5835	ID 33358, ID33360	NON
13030 (GSV?)	CG6499	ID33259	NON
	CG42404		ND
	CG4264 (Hsc70-4)	ID 26465	OUI
9020 (GSV6)	CG2050 (mod)		ND
	CG1487 (kurtz)	ID 41559	NON
12329 (GSV6)	CG4444 (px)	ID 40524, ID 40523	NON
13248 (GSV6)	CG3924 (Chip)	ID 43934	NON
	CG3167 (MAN1)		ND
22994 (GSV7)	CG9131 (kisir)	ID 44362, ID 44363	NON
	CG9127 (ade-2)	ID 47971, ID 47972	NON
	CG12393		ND
12796 (GSV6)	CG12006		ND
	CG32262		ND
	CG1065 (Scs α)		ND
10416 (GSV6)	CG12919 (egr)		ND
	CG1371		ND

Figure 2 : Identification des gènes dont la surexpression est nécessaire au sauvetage du phénotype induit par Mib1^{C2105S}

Pour chaque lignée GS sont indiqués : les gènes candidats considérés, la référence des lignées RNAi qui ont été testées et leur effet sur le sauvetage du phénotype Mib1^{C2105S} par le GS correspondant. ND signifie « non déterminé », la lignée RNAi n'existant pas ou n'ayant pas été combinée au GS. NON signifie que le RNAi n'a pas d'effet sur le sauvetage du phénotype Mib1^{C2105S} par le GS. OUI signifie que le RNAi bloque le sauvetage du phénotype Mib1^{C2105S} par le GS, et donc que la surexpression du gène ciblé (indiqué en rouge) est nécessaire au sauvetage de *mib1*.

2 Identification des gènes candidats qui présentent un phénotype en perte de fonction potentiellement lié à la signalisation Notch

Sur les 31 gènes candidats, 4 n'ont pas de lignée RNAi disponibles : *tacc*, *Srp54*, *modulo* et *CG12393*. Sur les 26 gènes pour lesquels une lignée RNAi existe (Figure 3) :

-11 ne présentent pas de phénotype RNAi en surexpression dans l'aile et le notum ;

-8 présentent un phénotype de létalité ou de malformation ;

-et 9 gènes présentent un phénotype RNAi potentiellement lié à la signalisation Notch, avec des encoches dans l'aile et/ou une variation de la densité des soies sensorielles du notum. Leur lien avec la signalisation Notch et le trafic membranaire reste à tester, en particulier dans les cas de réduction de la densité des soies sensorielles et de malformation du notum qui peuvent être associés à de la mort cellulaire. Sur ces 9 gènes seul *Hsc70-4* a été identifié comme étant responsable de l'interaction avec *mib1*. Les lignées RNAi contre *neur* et *CG42404* n'ayant pas été combinées avec leur GS respectif, le blocage du sauvetage de *Mib1^{C1205S}* n'a pas été testé. Si les lignées RNAi des 7 autres gènes (*Kapα3*, *CG11779*, *nanos*, *px*, *Chip* et *Kisir*) induisent un phénotype dans l'aile et/ou le notum, elles ne bloquent pas le sauvetage du phénotype *Mib1^{C1205S}* par leur GS respectif.

Il est possible que dans ces cas, les RNAi ne soient pas exprimées à un niveau suffisant pour avoir un effet sur le niveau d'expression du gène surexprimé par le GS. Il est aussi possible que ces phénotypes ne soient pas dus à un défaut de signalisation Notch, en effet une augmentation de la densité des soies sensorielles peut être dû à une augmentation de l'apoptose dans les cellules épidermales par exemple. Enfin il est possible que l'interaction avec *mib1* soit le résultat de l'effet combiné de l'expression de plusieurs gènes activés par un élément GS.

GS (vector)	Gène candidat	Lignées RNAi	Phénotype dans l'aile (par Ser-Gal4 tub-Gal80 ^{ts})	Phénotype dans le notum (par pnr-Gal4 tub-Gal80 ^{ts})
11668 (GSV6)	CG11988 (neur)	11988R-1	no phenotype	gain of bristle density
15585 (GSV6)	CG11988 (neur)	11988R-1	no phenotype	gain of bristle density
	CG11990	ID 28317	pupal lethality	ND
2078 (GSV1)	CG17223 (α 4GT1)	ID 2608, ID 2609	no phenotype	no phenotype
	CG3542	ID 26227	no phenotype	bristle morphology defects, notum malformation, death
13211 (GSV6)	CG9765 (tacc)	ND	ND	ND
7314 (GSV2)	CG8273	ID 2885, ID 2887	no phenotype	no phenotype
	CG9423 (Kap- α 3)	ID 36104	no phenotype	empty or multiple sockets , notum malformation migration
10040 (GSV6)	CG4602 (Srp54)	ND	ND	ND
	CG5899	ID 15681, ID15679	no phenotype	no phenotype
	CG4600 (yip-2)	ID26562	no phenotype	no phenotype
	CG13124	ID29648, ID29649	no phenotype	no phenotype
12332 (GSV6)	CG11779	ID16309	no phenotype	loss of bristle density , bristle morphology defects, notum malformation, death
	CG5637 (nanos)	ID22693	little wing notches	pupal lethality
	CG5835	ID 33358, ID33360	no phenotype	no phenotype
13030 (GSV?)	CG6499	ID33259	no phenotype	no phenotype
	CG42404	ID 26490, ID 26491	ND	gain of bristle density , notum colour defects, bistle morphology defects
	CG4264	ID 26465	Wing notches + naked	notum malformation death, loss of

	(Hsc70-4)		zones at the wing basis	bristles
9020 (GSV6)	CG2050 (mod)	ND	ND	ND
	CG1487 (kurtz)	ID 41559	No phenotype	lethality
12329 (GSV6)	CG4444 (px)	ID 40524, ID 40523	no phenotype	loss of bristle density
13248 (GSV6)	CG3924 (Chip)	ID 43934	wing notches	gain of bristles, morphology defects, malformation
	CG3167 (MAN1)	ID 11149	no phenotype	no phenotype
22994 (GSV7)	CG9131 (kisir)	ID 44362, ID 44363	no phenotype	weak loss of bristle, bristle morphology defects, planar polarity defects, notum malformation death
	CG9127 (ade-2)	ID 47971, ID 47972	no phenotype	no phenotype
	CG12393	ND	ND	ND
12796 (GSV6)	CG12006	ID 39481	no phenotype	no phenotype
	CG32262	ID 7472, ID 44923	no phenotype	no phenotype
	CG1065 (Scs α)	ID 27798, ID 27295	ND	bristle morphology defects
10416 (GSV6)	CG12919 (egr)	ID 45253, ID 45252	no phenotype	no phenotype
	CG1371	ID 13276, ID13275	no phenotype	no phenotype

Figure 3 : Phénotypes RNAi des gènes candidats dans l'aile et le notum

Pour tous les gènes candidats sont indiqués : la référence des lignées RNAi utilisées, le phénotype de surexpression du RNAi dans l'aile drivée par Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts} et passé à température permissive (28°C) après 2j de ponte à 25°C et dans le notum drivée par pnr-Gal4 tub-Gal80^{ts} passé à 28°C après 2j de ponte à 25°C.

ND signifie « non déterminé », la lignée RNAi n'existant pas.

Les phénotypes qui ont un lien potentiel avec la signalisation Notch sont indiqués en rouge. Une augmentation de la densité des soies sensorielles (noté « gain of bristle density ») et la présence d'encoques dans les ailes (noté « wing notches » ou « wing nicks ») peuvent refléter un défaut de signalisation Notch. Au contraire, une diminution de la densité des soies sensorielles (noté « loss of bristles »), ou l'absence de soie et la présence de plusieurs cellules socles (noté « empty or multiple sockets ») peuvent refléter un excès de signalisation Notch.

CHAPITRE 2:

Analyse du rôle des glycosphingolipides dans la signalisation
Notch chez la drosophile

Résumé du chapitre 2

J'ai ensuite investigué le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch car sa surexpression a rapidement été identifiée comme étant responsable du sauvetage de *mib1* par le GS2078. Hsc70-4 a été identifié beaucoup plus tardivement.

Le contexte :

$\alpha 4GT1$ est une $\alpha 1,4$ -N-acétylgalactosaminyltransferase. Son activité *in vitro* avait déjà été analysée (Mucha, Domlatil et al. 2004), et cette enzyme est capable de produire *in vitro* le glycosphingolipide (GSL) N5 à partir de N4. Cela se situe dans la voie de biosynthèse des GSL en aval des enzymes Egghead (Egh) et Brainiac (Brn) respectivement responsables de la synthèse des GSLs N2 et N3 (La voie de biosynthèse des glycosphingolipides est représentée dans la partie 3.6.3 de l'introduction figure 16B, (Mucha, Domlatil et al. 2004)). Les pertes de fonction maternelle et zygotique d'*egghead* (*egh*) et *brainiac* (*brn*), induisent une létalité embryonnaire associée à un phénotype de défaut de la sécrétion de la cuticule (Goode, Melnick et al. 1996). Ce phénotype est superficiellement similaire aux phénotypes de cuticule atrophiée observés lorsqu'un défaut de signalisation Notch entraîne un excès de spécification neurale par rapport aux cellules épidermales qui sont responsables de la sécrétion de la cuticule (voir la partie 3.2. de l'annexe 2). En plus, chez *C. elegans*, les orthologues d'*egh* et *brn*, respectivement *bre-3* et *bre-5*, malgré leur absence de phénotype, ont été identifiés comme étant des suppresseurs de différentes formes activées de *lin-12* (l'orthologue de Notch chez *C. elegans*) dans différents contextes de spécification cellulaire médiée par la signalisation Notch (Katic, Vallier et al. 2005) (voir la partie 3.6.3 de l'introduction). Il a aussi été montré que *bre-3* et *bre-5* agissent en amont de l'activation de *lin-12*, et jouent rôle du côté des ligands dans la cellule signalisatrice pour moduler l'activité de *Lin-12* dans la cellule réceptrice (Katic, Vallier et al. 2005). L'ensemble de ces données, ainsi que l'implication *bre-3* et *bre-5* dans l'internalisation de la toxine du *Bacillus thuringiensis* (Griffitts, Whitacre et al. 2001; Griffitts, Haslam et al. 2005) (voir la partie 3.6.3 de

l'introduction), laissent penser que les GSLs pouvaient avoir un rôle dans la régulation de l'endocytose et de la signalisation Notch.

Les résultats :

L'activation du GS2078 sauve la mise en place de la marge de l'aile et la spécification des soies sensorielles sur le notum dans différents contextes de perte partielle d'activité de Neur et de Mib1 : dominants négatifs, RNAi, allèle hypomorphe. L'effet positif du GS2078 sur la signalisation Notch, qui est due à une surexpression du gène $\alpha 4GT1$, n'est donc spécifique ni du tissu, ni de l'ubiquitine ligase impliquée (Mib1/Neur). Pour analyser le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch, j'ai généré différents allèles nuls, sans détecter aucun phénotype, mais la perte de fonction d' $\alpha 4GT1$ aggrave le phénotype d'encoche de l'haploinsuffisance de Notch. Cela confirme qu' $\alpha 4GT1$ joue un rôle positif dans la signalisation Notch, ce rôle n'étant révélé que lorsque celle-ci est perturbée. $\alpha 4GT1$ ayant un homologue $\alpha 4GT2$ qui se comporte aussi comme un suppresseur du phénotype induit par Mib1^{C1205S}, j'ai analysé le double mutant $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$ sans déceler non plus de phénotype. Cela signifie que ces gènes, qui jouent un rôle modulateur, ne sont pas essentiels à la signalisation Notch..

Le phénotype de la perte de fonction maternelle et zygotique de *brn* dans l'embryon, décrit précédemment par Goode et al (Goode, Melnick et al. 1996), a été réinvestigé. L'analyse des embryons *brn* confirme le phénotype de cuticule, mais sans l'associer à un excès de différenciation neurale et à un défaut de signalisation Notch. Si la spécification du système nerveux ne semble pas perturbé, cette analyse a révélé un phénotype nouveau de *brn* dans le maintien de la localisation apicale de Patj. Ce rôle potentiel des GSLs dans le maintien de la polarité apicale des cellules dans l'embryon reste à analyser.

Pour mieux comprendre le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation dépendant de *mib1*, j'ai analysé les conséquences de sa surexpression sur le trafic des ligands. J'ai montré que la surexpression d' $\alpha 4GT1$ sauve les défauts de localisation des ligands de Notch induits par une perte partielle d'activité *mib1*, induites par Mib1^{C1205S} et *mib1*^{RNAi}, et restaure l'endocytose de DI dans le contexte du dominant-négatif Mib1^{C1205S} dans

l'aile mais aussi dans les SOP dans le contexte de réduction et/ou d'une inhibition de l'activité de Neur. La perte d'activité d' $\alpha 4GT1$ et $\alpha 4GT2$ n'a néanmoins aucun effet détectable sur l'endocytose de DI.

J'ai ensuite pu montrer, grâce à une lectine spécifique des résidus α GalNac terminaux et à l'analyse de la mobilité chromatographique des GSLs extraits de larves, qu' $\alpha 4GT1$ régule *in vivo* la biosynthèse des GSLs en aval d'Egh et Brn et permet la production de N5 à partir de N4, et que cette activité est requise pour restaurer l'activité signalisatrice des ligands.

Si la modulation de la signalisation Notch par la surexpression d' $\alpha 4GT1$ et l'implication des GSLs est claire, le mécanisme de restauration de la signalisation par la modulation de la voie de biosynthèse des GSLs reste floue. Pour avancer vers un mécanisme, nous avons testé l'hypothèse d'une interaction directe entre les ligands de Notch et les GSLs. Nous avons identifié, en collaboration avec Jacques Fantini, un motif d'interaction potentiel aux glycosphingolipides (GBM pour Glycosphingolipid Binding Motif) dans les domaines extracellulaires de Delta et de Serrate. Ce motif d'une dizaine d'acides aminés, basé sur un tryptophane, est nommé GBM pour GSL Binding Motif. Il se situe dans le domaine N2 de la partie N-terminal des ligands de Notch et est conservé chez les mammifères. Quatre mutations du gène humain *Jagged1* (orthologue de Ser) à l'origine du syndrome Alagille ont été cartographiées au niveau de ce GBM (Crosnier, Driancourt et al. 1999) (Ropke, Kujat et al. 2003). Le peptide GBM interagit *in vitro* avec une monocouche lipidique enrichie en GSLs extraits de larves et cette interaction dépend du Trp. Nous avons ensuite montré que la partie N-terminale de Ser qui inclut les domaines N1, N2 et DSL, interagit avec les GSLs, que cette interaction dépend du GBM et de son Trp, et qu'elle est sensible au niveau de N5 et/ou N4. La fonction du GBM dans le trafic et la signalisation des ligands de Notch reste encore à tester *in vivo*, mais ces résultats *in vitro* constituent un premier pas vers la compréhension du rôle des GSLs dans l'activité signalisatrice des ligands de Notch et suggèrent une interaction directe ligands/GSLs.

Le microenvironnement lipidique des ligands de Notch chez la drosophile *in vivo* n'est pas connu. Les microdomaines membranaires enrichis en GSLs et stérol étant potentiellement isolables biochimiquement grâce à leur propriété de résistance à la solubilisation par des détergents, j'ai tenté d'isoler des domaines membranaires

résistants à la solubilisation par le Brij98, dans l'embryon (le choix de l'embryon est motivé par des raisons techniques détaillées dans la partie 2 de l'annexe du chapitre). DI est retrouvé dans les fractions membranaires résistantes au détergent, alors que Notch, qui colocalise avec DI dans ce tissu, est à la fois dans des fractions membranaires résistantes et des fractions membranaires solubles au détergent. Cette observation suggère que cette technique permet d'isoler des protéines transmembranaires associées à deux environnements lipidiques distincts à la membrane plasmique ou dans des endosomes, et elle est consistante avec la localisation du Delta-like 1 de mammifères dans des domaines membranaires enrichies en cholestérol et sphingolipides (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008).

Les modèles :

L'augmentation du niveau de N5 par la surexpression d' α 4GT1 compense donc les réductions d'activités des ubiquitine ligases Mib1 et Neur, et restaure l'endocytose de DI. Un fort niveau de N5 régule donc positivement l'endocytose de DI en contexte sensibilisé pour le trafic de DI. L'augmentation du niveau de N5 pourraient :

-avoir un effet positif général sur l'endocytose (ce qui n'a pas l'air d'être le cas car la surexpression d' α 4GT1 n'a pas d'effet visible sur l'internalisation du dextran, ou de FM4-64) ;

-avoir effet indirect sur l'activité enzymatique de Mib1 et Neur ;

-ou modifier la distribution et l'organisation des lipides à la membrane plasmique promouvant ainsi l'organisation de nanodomains spécifiques. La surexpression d' α 4GT1 pourrait ainsi modifier la distribution de cargos spécifiques comme DI et Ser qui procèdent un motif d'interaction aux GSLs. Le regroupement des ligands dans les nanodomains enrichis en N5 pourrait alors faciliter leur endocytose et leur activité signalisatrice.

En résumé, ce travail révèle une nouvelle fonction régulatrice, mais pas essentielle, des GSLs chez la drosophile, et établit un nouveau lien fonctionnel entre l'endocytose des ligands de Notch qui dépend des ubiquitine ligases et des GSLs spécifiques.

Notch ligand activity is modulated by glycosphingolipid membrane composition in *Drosophila melanogaster*

Sophie Hamel,¹ Jacques Fantini,² and François Schweisguth¹

¹Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique URA2578, 75724 Paris, Cedex 15, France

²Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6231, Faculté St. Jérôme, University of Aix-Marseille II and III, 13397 Marseille, Cedex 20, France

[AQ1] **E**ndocytosis of the transmembrane ligands Delta (Dl) and Serrate (Ser) is required for the proper activation of Notch receptors. The E3 ubiquitin ligases Mindbomb1 (Mib1) and Neuralized (Neur) regulate the ubiquitination of Dl and Ser and thereby promote both ligand endocytosis and Notch receptor activation. In this study, we identify the $\alpha 1,4$ -N-acetylgalactosaminyltransferase-1 ($\alpha 4GT1$) gene as a gain of function suppressor of Mib1 inhibition. Expression of $\alpha 4GT1$ suppressed the signaling and endocytosis defects of Dl and Ser resulting

from the inhibition of *mib1* and/or *neur* activity. Genetic and biochemical evidence indicate that $\alpha 4GT1$ plays a regulatory but nonessential function in Notch signaling via the synthesis of a specific glycosphingolipid (GSL), N5, produced by $\alpha 4GT1$. Furthermore, we show that the extracellular domain of Ser interacts with GSLs in vitro via a conserved GSL-binding motif, raising the possibility that direct GSL-protein interactions modulate the endocytosis of Notch ligands. Together, our data indicate that specific GSLs modulate the signaling activity of Notch ligands.

Introduction

The plasma membrane includes structurally diverse lipids and proteins that are spatially distributed in a heterogeneous manner to form dynamic nanoscale assemblies (Hancock, 2006; Lingwood and Simons, 2010) that appear to be poised to cluster (Lingwood et al., 2008). Dynamic changes in the spatial organization of these domains may critically alter cell-cell signaling (Lajoie et al., 2009).

Cell-cell signaling mediated by Notch receptors regulates a wide range of developmental processes, and perturbations of Notch signaling activity underlie various human diseases. The molecular mechanism of Notch signaling is remarkably simple. Notch is a transmembrane protein with an intracellular domain corresponding to a transcriptional coactivator and with an extracellular ligand-binding domain. After interaction of Notch with its extracellular ligands, intramembrane proteolytic cleavage of Notch results in the release of the intracellular domain from the

membrane and transcriptional activation of Notch target genes. Activation of Notch is thus irreversible, and a plethora of post-translational regulatory mechanisms control this irreversible step (for reviews see Bray, 2006; Fortini, 2009; Kopan and IJagan, 2009; Tien et al., 2009). One key mechanism involves ubiquitination of the Notch ligands. In *Drosophila melanogaster*, Notch is activated in trans by the transmembrane proteins Delta (Dl) and Serrate (Ser). Genetic studies have indicated that ubiquitination of Dl and Ser by E3 ubiquitin ligases of the Mindbomb (Mib1) and/or Neuralized (Neur) is essential for Notch receptor activation in signal-receiving cells (for review see Le Borgne et al., 2005a). Mib1 is a conserved RING finger E3 ubiquitin ligase required for the internalization and/or endosomal sorting of Notch ligands (Itoh et al., 2003; Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005b). Transfection studies have indicated that Mib1 directly interacts with and ubiquitinates the intracellular tails of Dl and Ser (Itoh et al., 2003; Chen and Casey Corliss, 2004; Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005b). Although the importance of ligand endocytosis for Notch acti-

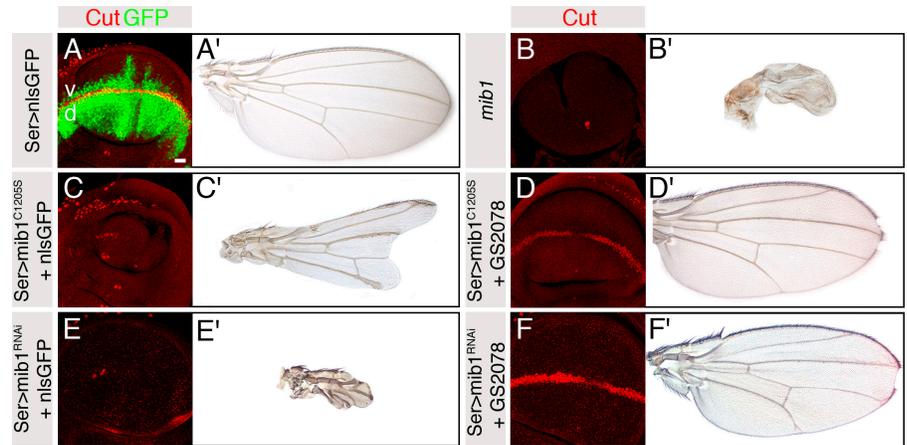
Correspondence to François Schweisguth: fschweis@pasteur.fr

Abbreviations used in this paper: $\alpha 4GT1$, $\alpha 1,4$ -N-acetylgalactosaminyltransferase-1; Brn, Brainiac; Cer, ceramide; Dl, Delta; Dlg, Discs large; E-Cad, E-cadherin; EGFR, EGF receptor; Egh, Egghead; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GBM, GSL-binding motif; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GSL, glycosphingolipid; HPA, *Helix pomatia* agglutinin; HPTLC, high performance thin layer chromatography; iDl, internalized Dl; Mib1; Mindbomb1; Neur, Neuralized; Ser, Serrate; SOP, sensory organ precursor; UAS, upstream activating sequence.

© 2010 Hamel et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Figure 1. **Suppression of *mib1* by GS2078.**

(A–F') Genetic interactions between *mib1* and GS2078 were studied in third instar wing imaginal discs (A, B, C, D, E, and F) and in adult wings (A', B', C', D', E', and F'). (A) The pattern of Ser-Gal4 expression was visualized using nlsGFP (green), and wing margin cells were identified using Cut (red). (A and A') Wild-type control *UAS-nlsGFP/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^S/+* flies (*Ser > nlsGFP*) expressed nuclear GFP in dorsal (d) cells as well as in some ventral (v) cells. Notch activation along the dorso-ventral boundary results in Cut expression at the wing margin. (B and B') Trans-heterozygous *mib1²/mib1³* mutant disc and wing. Defective wing margin formation and wing pouch growth (B) result in a strong wing loss phenotype (B'). (C and C') Expression of Mib1^{C1205S} in *UAS-nlsGFP/UAS-mib1^{C1205S}; Ser-Gal4 tub-Gal80^S/+* flies (*Ser > mib1^{C1205S} + nlsGFP*) led to defective wing margin specification and reduced growth of the pouch. (D and D') GS2078 suppressed the Mib1^{C1205S}-induced phenotype in *UAS-mib1^{C1205S}/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^S/GS2078* flies (*Ser > mib1^{C1205S} + GS2078*). Cut expression at the wing margin and wing pouch growth were significantly rescued. (E and E') Down-regulation of *mib1* expression in *UAS-nlsGFP/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^S UAS-mib1^{RNAi}/+* flies (*Ser > mib1^{RNAi} + nlsGFP*) gave a *mib1* partial loss of function phenotype (compare with B and B'). (F and F') GS2078 suppressed the hypomorphic *mib1* phenotype in *Ser-Gal4 tub-Gal80^SUAS-mib1^{RNAi} GS2078/GS2078* flies (*Ser > mib1^{RNAi} + GS2078*). Cut expression at the wing margin and tissue growth were largely restored. Bar, 10 μ m.



vation is well established, important questions remain. Indeed, it is not clear how ligand ubiquitination and endocytosis control receptor activation (D'Souza et al., 2008). Also, the steps at which Mib1 act during Notch ligand endocytosis and the factors, proteins, and lipids that contribute to this activity of Mib1 are largely not known.

In this study, we identify and characterize the α 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase1 (α 4GT1) gene as a gain of function suppressor of *mib1* in *Drosophila*. Our genetic and biochemical analysis of α 4GT1 function indicates that specific changes in glycosphingolipid (GSL) composition can rescue the defects in DI and Ser trafficking and signaling seen upon inhibition of *mib1* activity, thereby establishing a new functional link between GSLs and Notch signaling.

Results

Genetic identification of a dominant suppressor of *mib1*

To gain novel insights into the role and regulation of Notch ligand trafficking, we performed a genetic modifier screen for gain of function suppressors of a dominant-negative form of Mib1 (unpublished data). This mutant form of Mib1, Mib1^{C1205S}, was engineered by mutating a highly conserved amino acid of the catalytic C-terminal ring finger shown to disrupt Mib function in zebrafish (Itoh et al., 2003; Bardin and Schweisguth, 2006; Zhang et al., 2007). Conditional overexpression of Mib1^{C1205S} in wing imaginal discs inhibited Notch signaling as revealed by the loss of Cut and Wingless expression at the wing margin (Fig. 1, A and C; and not depicted) and by the nicks seen in adult fly wings (Fig. 1, A' and C'). These phenotypes are similar to, albeit less severe than, the *mib1* mutant phenotypes (Fig. 1, B and B'). These phenotypes were suppressed by the expression of wild-type Mib1 (unpublished data), indicating that Mib1^{C1205S} interferes in a dominant-negative manner with the activity of endogenous Mib1.

A genetic screen for gain of function suppressors of the wing phenotype induced by Mib1^{C1205S} was performed using a collection of 4,000 Gene Search fly lines (unpublished data), each carrying a single, randomly inserted P-element with upstream activating sequences (UASs) at both ends (Toba et al., 1999). In this screen, UAS sequences were used to activate the transcription of endogenous genes located next to the Gene Search element using a *Ser*-GAL4 driver. This screen identified the GS2078 element as a strong suppressor of the wing phenotypes associated with Mib1^{C1205S} expression (Fig. 1, D and D').

RNAi-mediated knockdown of *mib1* activity in wing imaginal discs using *Ser*-GAL4 produces a wing phenotype similar in strength to the one seen with Mib1^{C1205S} (Fig. 1, E and E'). The GS2078 element efficiently suppressed this partial loss of *mib1* function phenotype (Fig. 1, E–F'). It also reduced the penetrance of a wing nick phenotype seen in an hypomorphic heteroallelic combination of *mib1* mutant alleles (Fig. 2, H and I). However, it did not suppress the *mib1*-null mutant phenotype (Fig. 2, J–L). These genetic data indicate that the GS2078 element acts as a dominant suppressor of *mib1*.

The α 4GT1 gene is a gain of function suppressor of *mib1*

The GS2078 element is inserted 5' to the *CG3542* and α 1,4-N-acetylgalactosyltransferase 1 (α 4GT1) genes (Fig. 2 A) and may therefore direct the overexpression of both genes. However, several lines of evidence demonstrate that overexpression of α 4GT1 is responsible for the effect of GS2078. First, the EP797 element that directs the expression of the α 4GT1 gene (Protzer et al., 2009) suppressed the Mib1^{C1205S}-induced wing phenotypes (unpublished data). Second, overexpression of α 4GT1 using a UAS-cDNA construct also suppressed the Mib1^{C1205S}-induced defects (Fig. 2 C). Third, RNAi-mediated inactivation of the α 4GT1 gene blocked suppression by GS2078 (Fig. 2, E and F), indicating that overexpression of endogenous α 4GT1 is required to suppress the Mib1^{C1205S}-induced wing

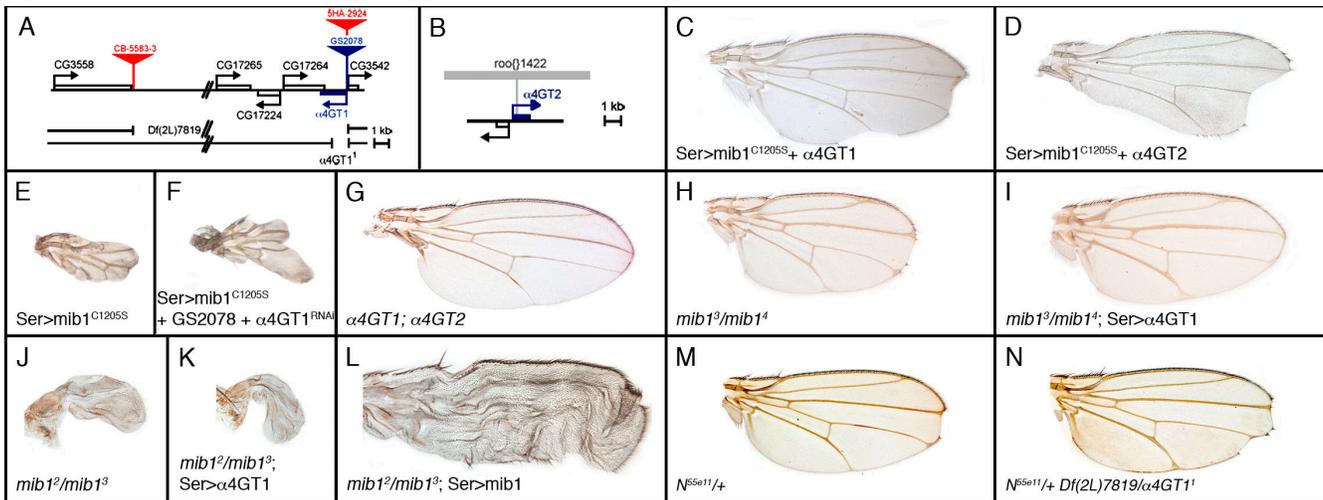


Figure 2. **$\alpha 4GT1$ is a gain of function suppressor of $mib1$.** (A) Molecular map showing that the GS2078 P-element (blue) is inserted between and upstream of the $\alpha 4GT1$ and CG3542 genes. The breakpoints of the *Df(2L)7819* and of the small $\alpha 4GT1^1$ deletions are indicated. *Df(2L)7819* deletes 24 kb of genomic DNA located between the 5HA-2924 and CB-5583-3 P-elements (red). It deletes the $\alpha 4GT1$, CG17264, CG17224, and CG17265 genes and also partially deletes the CG3542 gene. The $\alpha 4GT1^1$ allele is a 1,201-nucleotide-long deletion that removes the sequence encoding the first 286 amino acids of the $\alpha 4GT1$ protein. Bar, 1 kb. (B) Molecular map of the $\alpha 4GT2$ locus. The position of the roo 1,422 element disrupting the $\alpha 4GT2$ open reading frame (red; transcript is in blue) in the $\alpha 4GT2^1$ mutant allele is indicated. (C and D) Expression of $\alpha 4GT1$ in *UAS-mib1^{C1205S}/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^S/UAS- $\alpha 4GT1$* flies (*Ser > mib1^{RNAi} + $\alpha 4GT1$* ; C) and $\alpha 4GT2$ in *UAS-mib1^{C1205S}/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^S/UAS- $\alpha 4GT2$* flies (*Ser > mib1^{RNAi} + $\alpha 4GT2$* ; D) suppressed the *Mib1^{C1205S}*-induced wing phenotypes. (E and F) RNAi-mediated down-regulation of $\alpha 4GT1$ blocked suppression by GS2078 of the *Mib1^{C1205S}*-induced wing phenotype in *UAS-mib1^{C1205S}; Ser-Gal4 tub-Gal80^S/GS2078; UAS- $\alpha 4GT1^{RNAi}$ /+* (*Ser > mib1^{C1205S} + GS2078 + $\alpha 4GT1^{RNAi}$* ; F). Note that the *Ser > mib1^{C1205S}* wing phenotype (E) is stronger than the one shown in Fig. 1 C'. This is because the x-linked *mib1^{C1205S}* transgene is expressed at higher levels in males (E and F) than in females (Fig. 1 C'). (G) $\alpha 4GT1^1/Df(2L)7819$; $\alpha 4GT2^1$ double-mutant flies have no detectable phenotype (compare with Fig. 1 A'). (H–L) Expression of $\alpha 4GT1$ suppressed the hypomorphic *mib1* wing nick phenotype. (H and I) GS2078 lowered the penetrance of the hypomorphic *mib1³/mib1⁴* wing nick phenotype: 11% ($n = 194$) of the *mib1³/mib1⁴* wings exhibited nicks (H), whereas only 1% ($n = 202$) of *Ser-Gal4 tub-Gal80^S/GS2078; mib1³/mib1⁴* wings had nicks (I). In contrast, expression of $\alpha 4GT1$ did not suppress the *mib1*-null phenotype. (J–L) The wing phenotype of *mib1²/mib1³* flies (J) was rescued by the expression of *mib1* (L) but was not modified by the expression of $\alpha 4GT1$ in *Ser-Gal4 tub-Gal80^S/GS2078; mib1³/mib1⁴* flies (K). (M and N) Loss of $\alpha 4GT1$ function enhances the severity and penetrance of the haploinsufficient wing *Notch* phenotype: 19% ($n = 16$; 25°C) and 15% ($n = 20$; 29°C) of the *N^{55e11}* heterozygous flies show a small wing nick, whereas 66% ($n = 132$; 25°C) and 100% ($n = 26$; 29°C) exhibit nicks of increased size in the complete absence of $\alpha 4GT1$ activity. Double-heterozygous *Notch $\alpha 4GT1$* flies were similar to *N^{55e11}* heterozygous flies in severity and penetrance. *N^{55e11}/+; $\alpha 4GT1^1/+$* : 32% ($n = 125$) and *N^{55e11}/+; Df(2L)7819/+*: 28% ($n = 96$) at 25°C.

phenotypes. Therefore, we conclude that $\alpha 4GT1$ overexpression is sufficient to suppress the *Mib1^{C1205S}*-induced defects and necessary for their suppression by GS2078. Together, our data identify the $\alpha 4GT1$ gene as a gain of function suppressor of *mib1*.

$\alpha 4GT1$ is a nonessential Notch enhancer gene

The $\alpha 4GT1$ gene encodes a ubiquitously expressed enzyme predicted to regulate GSL biosynthesis (Chen et al., 2007; Protzer et al., 2009). To investigate the role of the $\alpha 4GT1$ gene in Notch signaling, we generated two molecularly null mutant alleles: the $\alpha 4GT1^1$ allele deletes the first 286 amino acids of the $\alpha 4GT1$ protein, and the $\alpha 4GT1^2$ allele carries a nonsense mutation at K131. We also generated a small molecularly mapped deletion, *Df(2L)7819*, that removes the $\alpha 4GT1$ gene together with four additional predicted genes (Fig. 2 A). Flies trans-heterozygous for $\alpha 4GT1^1$, $\alpha 4GT1^2$, and/or *Df(2L)7819* are viable and fertile, indicating that the $\alpha 4GT1$ is a nonessential gene (Protzer et al., 2009; unpublished data). However, a complete loss of $\alpha 4GT1$ activity significantly enhanced the haplo-insufficient *Notch* mutant wing phenotype in both severity and penetrance (Fig. 2, M and N). This indicates that $\alpha 4GT1$ plays a positive role in

Notch signaling that can only be seen upon reduced Notch receptor activation.

Because the *Drosophila* genome encodes a second $\alpha 4GT$ gene, $\alpha 4GT2$ (Chen et al., 2007), which also behaved as a gain of function suppressor of *Mib1^{C1205S}* (Fig. 2 D), we tested whether $\alpha 4GT2$ acts redundantly with $\alpha 4GT1$. We identified an $\alpha 4GT2$ mutant allele, $\alpha 4GT2^1$, with a roo{1,422} element disrupting the $\alpha 4GT2$ open reading frame (see Materials and methods; Fig. 2 B), generated $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ double-mutant flies, and found that these flies are phenotypically normal (Fig. 2 G). We conclude that the activities of the $\alpha 4GT1$ and $\alpha 4GT2$ genes are not strictly required for Notch signaling. Additionally, overexpression of $\alpha 4GT1$ did not result in morphologically visible phenotypes (see Fig. 6 C and not depicted). Thus, $\alpha 4GT1$ and possibly $\alpha 4GT2$ play a nonessential modulatory role in Notch signaling.

$\alpha 4GT1$ overexpression suppressed *mib1*-dependent localization defects of DI and Ser

To gain insight into the role of $\alpha 4GT1$ in *mib1*-dependent signaling, we first investigated whether *Mib1^{C1205S}* perturbed the distribution of DI and Ser in wing disc epithelial cells. In wild-type cells, DI and Ser were detected into intracellular dots

[AQ2]

corresponding to endocytic vesicles and at the cortex where they colocalized with Patj, Crumbs, and E-cadherin (E-Cad; Fig. 3, A–B''; and Fig. S1) and Notch (Fig. S2; Sasaki et al., 2007) apical to Discs large (Dlg; Fig. 3, G–G'''). Expression of Mib1^{C1205S} resulted in the accumulation of Dl and Ser in large apical dots (Fig. 3, C–D'' and H–H'''; and Figs. S1 and S2), whereas localization of Patj, Crumbs, and E-Cad were unchanged (Fig. S1). Cell surface staining experiments using antibodies directed against the extracellular domains of Dl and Ser indicated that Dl and Ser accumulated at the apical plasma membrane in Mib1^{C1205S}-expressing cells (Fig. S3). Dl and Ser colocalized with a YFP-tagged version of Mib1^{C1205S} (Fig. 3, H–H'''). This accumulation of Mib1^{C1205S} into dots did not depend on Dl and Ser (Fig. S2). Of note, these defects in Dl and Ser distribution differ from those seen in *mib1* mutant cells. Ser accumulated uniformly at the apical membrane in the absence of Mib1, whereas Dl localization remains unaffected (Fig. S2; Itoh et al., 2003; Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005b). Furthermore, we noticed that Notch coaccumulated with Dl and/or Ser in Mib1^{C1205S}-expressing and *mib1* mutant cells (Fig. S2, C–H''). The accumulation of Notch into dots in Mib1^{C1205S}-expressing cells required the presence of Dl and Ser (Fig. S2, K–L''), indicating that this defective accumulation of Notch is a secondary consequence from the *mib1* defects in Dl and Ser accumulation. Together, these data suggest that Mib1^{C1205S} specifically altered the distribution of Dl and Ser by directly interacting with Dl and Ser and interfering with their endocytosis.

We then tested whether $\alpha 4GT1$ overexpression suppressed the defects in Dl and Ser accumulation induced by Mib1^{C1205S}. The localization of Dl and Ser in cells expressing both dominant-negative Mib1 and $\alpha 4GT1$ was very similar to the one observed in wild-type cells (Fig. 3, E–F'' and I–I'''; Figs. S2 and S3). Thus, $\alpha 4GT1$ suppressed the defects resulting from dominant-negative Mib1.

A similar suppression was observed in a context of partial loss of endogenous *mib1* activity. Cells with reduced *mib1* activity exhibited increased levels of Ser at the apical membrane (Fig. 4, A–D). This defect was suppressed by expression of $\alpha 4GT1$ (Fig. 4, E–F). We conclude that expression of $\alpha 4GT1$ rescued defects in Dl and Ser distribution caused by either dominant-negative Mib1 or reduced Mib1 activity.

$\alpha 4GT1$ overexpression restored endocytosis of Dl

We then investigated the basis of this suppression by $\alpha 4GT1$. We hypothesized that inhibition of Mib1 activity resulted in endocytosis defects and that $\alpha 4GT1$ expression restored the endocytosis of the Notch ligands. The endocytosis of Dl was monitored in wing imaginal discs using an antibody uptake assay. In wild-type discs, internalized Dl (iDl) was detected in all cells expressing Dl (Fig. 5, A–B'). Expression of Mib1^{C1205S} in dorsal cells using Ser-GAL4 strongly inhibited Dl endocytosis (Fig. 5, C–D'), and overexpression of $\alpha 4GT1$ in these cells restored endocytosis of Dl (Fig. 5, E–F').

We further investigated the role of $\alpha 4GT1$ in regulating the Neur-dependent endocytosis of Dl in the pupal thorax (Le Borgne and Schweisguth, 2003). First, we found that the

GS2078 element also suppressed the bristle phenotype that resulted from a partial loss of *neur* activity by RNAi (Fig. 6, I and K), the inhibition of Neur by Tom (Fig. 6, E and G; Bardin and Schweisguth, 2006), and the inhibition of Neur by dominant-negative Neur^{C701S} (the C701S mutation of Neur affects the same conserved amino acid of the RING finger as the C1205S mutation of Mib1; not depicted). Therefore, we conclude that $\alpha 4GT1$ can positively regulate both Neur- and Mib1-dependent signaling events. We then monitored the endocytosis of Dl in sensory organ precursor (SOP) cells using an antibody uptake assay. Expression of $\alpha 4GT1$ restored the endocytosis of Dl in SOPs in all experimental conditions of reduced and/or inhibited Neur activity (Fig. 6, E–L'; and not depicted). However, the loss of $\alpha 4GT1$ and $\alpha 4GT2$ activities had no detectable effect on the endocytosis of Dl in SOPs (unpublished data). The positive effect of $\alpha 4GT1$ expression on endocytosis may be cargo dependent because no major change in FM4-64 uptake was seen in cells overexpressing $\alpha 4GT1$ (unpublished data).

$\alpha 4GT1$ regulates GSL biosynthesis

$\alpha 4GT1$ has been shown to catalyze the in vitro addition of an *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) from a UDP-GalNAc donor to an α -GalNAc acceptor through an $\alpha 1,4$ linkage. In particular, $\alpha 4GT1$ efficiently transferred GalNAc to one of the major *Drosophila* GSLs, N4 or GalNAc- $\beta 1-4$ -*N*-acetylglucosamine (GlcNAc)- $\beta 1-3$ Man $\beta 1-4$ Glc $\beta 1-1$ -ceramide (Cer; Fig. 7A; Chen et al., 2007; Stolz et al., 2008). GSLs are key components of the outer leaflet of the plasma membrane that have been proposed to regulate the formation of raftlike assemblies (Degroote et al., 2004; Sillence, 2007). GSLs are synthesized in the Golgi apparatus by Golgi-localized glycosyltransferases. In *Drosophila*, GSLs consist primarily of a Glc $\beta 1$ -Cer core (GlcCer or N1) that can be elongated by the Egghead (Egh) GDP-mannose/ β Glc $\beta 1,4$ -mannosyltransferase to form Man $\beta 1-4$ Glc $\beta 1$ -Cer (N2; Wandall et al., 2003) and by the Brainiac (Brn) UDP-GlcNAc/ β Man $\beta 1,3$ -GlcNAc transferase that adds GlcNAc to form GlcNAc- $\beta 1-3$ Man $\beta 1-4$ Glc $\beta 1$ -Cer (N3; Fig. 7A; Müller et al., 2002; Wandall et al., 2005). The latter can be further extended by a $\beta 1,4$ -*N*-acetylgalactosyltransferase, $\beta 4$ -GalNAc-TA or $\beta 4$ -GalNAc-TB, to form N4, the predicted $\alpha 4GT1$ substrate (Haines and Irvine, 2005; Chen et al., 2007; Stolz et al., 2008).

To test whether $\alpha 4GT1$ acts in vivo as an *N*-acetylgalactosamine transferase for GSLs, we first examined the effect of both loss and gain of $\alpha 4GT1$ activity on the levels of terminal GalNAc at the surface of imaginal cells using the *Helix pomatia* agglutinin (HPA) lectin. This lectin selectively recognizes terminal α -GalNAc, present in N5, from other hexosyl, including the β -GalNAc of N4 (Sanchez et al., 2006; Iskratsch et al., 2009). We find that HPA cell surface staining was strongly reduced in clones of $\alpha 4GT1$ mutant cells, demonstrating that $\alpha 4GT1$ is active in imaginal cells (Fig. 7, B and B'). Conversely, overexpression of $\alpha 4GT1$ in clones of imaginal cells resulted in strong HPA cell surface binding (Fig. 7, C and C'), suggesting that $\alpha 4GT1$ is a limiting enzyme in this tissue. These data indicate that $\alpha 4GT1$ catalyzes the addition of GalNAc to a detergent-sensitive substrate present at the cell surface.

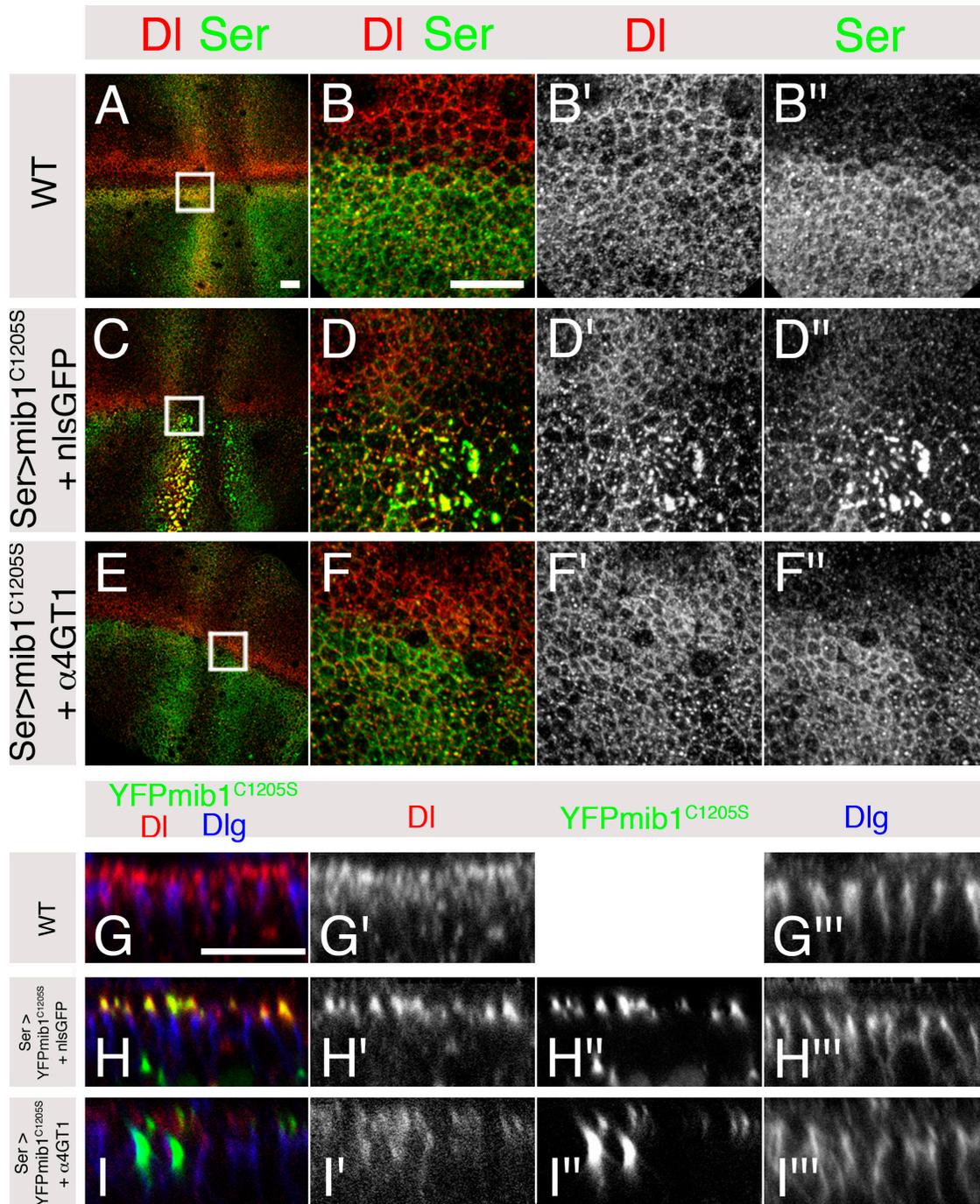


Figure 3. $\alpha 4GT1$ rescued $mib1^{C1205S}$ defects in DI and Ser distribution. Ser (green), DI (red), YFP/ $mib1^{C1205S}$ (green), and Dlg (blue) distribution were analyzed in wing imaginal discs. (A-I'') The following genotypes were studied: wild-type (WT; A-B'' and G-G'''), $UAS-nlsGFP/UAS-mib1^{C1205S}$; $Ser-Gal4 tub-Gal80^{\Delta}/+$ ($Ser > mib1^{C1205S} + nlsGFP$; C-D''), $UAS-nlsGFP/UAS-YFPmib1^{C1205S}$; $Ser-Gal4 tub-Gal80^{\Delta}/+$ ($Ser > YFPmib1^{C1205S} + nlsGFP$; H-H'''), $UAS-mib1^{C1205S}/+$; $Ser-Gal4 tub-Gal80^{\Delta}/GS2078$ ($Ser > mib1^{C1205S} + \alpha 4GT1$; E-F''), and $UAS-YFPmib1^{C1205S}/+$; $Ser-Gal4 tub-Gal80^{\Delta}/GS2078$ ($Ser > YFPmib1^{C1205S} + \alpha 4GT1$; I-I'''). Because DI and Ser have distinct expression patterns (A), we focused our analysis to a dorsal region located near the margin where cells coexpress DI and Ser. (B-F'') High magnification views of the areas boxed in A-E are shown. (G-I'') Z-section views are shown. (A-B'' and G-G''') In wild-type cells, DI (B' and G') and Ser (B'') colocalized at the apical cortex, apical to Dlg (G'''). (C-D'' and H-H''') Expression of $Mib1^{C1205S}$ (C-D'') or YFPmib1^{C1205S} (H-H''') led to the accumulation of DI (D', H') and Ser (D'') into dots at the apical cortex, apical to Dlg (H'''). (E-F'' and I-I''') Coexpression of $\alpha 4GT1$ with $Mib1^{C1205S}$ (E-F'') or YFPmib1^{C1205S} (I-I''') did not significantly change the distribution of DI (F' and I') and Ser (F'') compared with wild-type controls. Bars, 10 μm .

Next, we biochemically characterized the role of $\alpha 4GT1$ in GSL biosynthesis by studying the chromatographic mobility of GSLs extracted from wild-type and mutant larvae. As described previously (Wandall et al., 2005; Chen et al., 2007;

Stolz et al., 2008), five main GSL species were consistently detected (Fig. 7 D). These species were identified as Cer mono-, di-, tri-, tetra-, and pentahexoside and referred to as N1, N2, N3, N4, and N5, respectively, based on their mobility relative to

ROUGH GALLEY PROOF

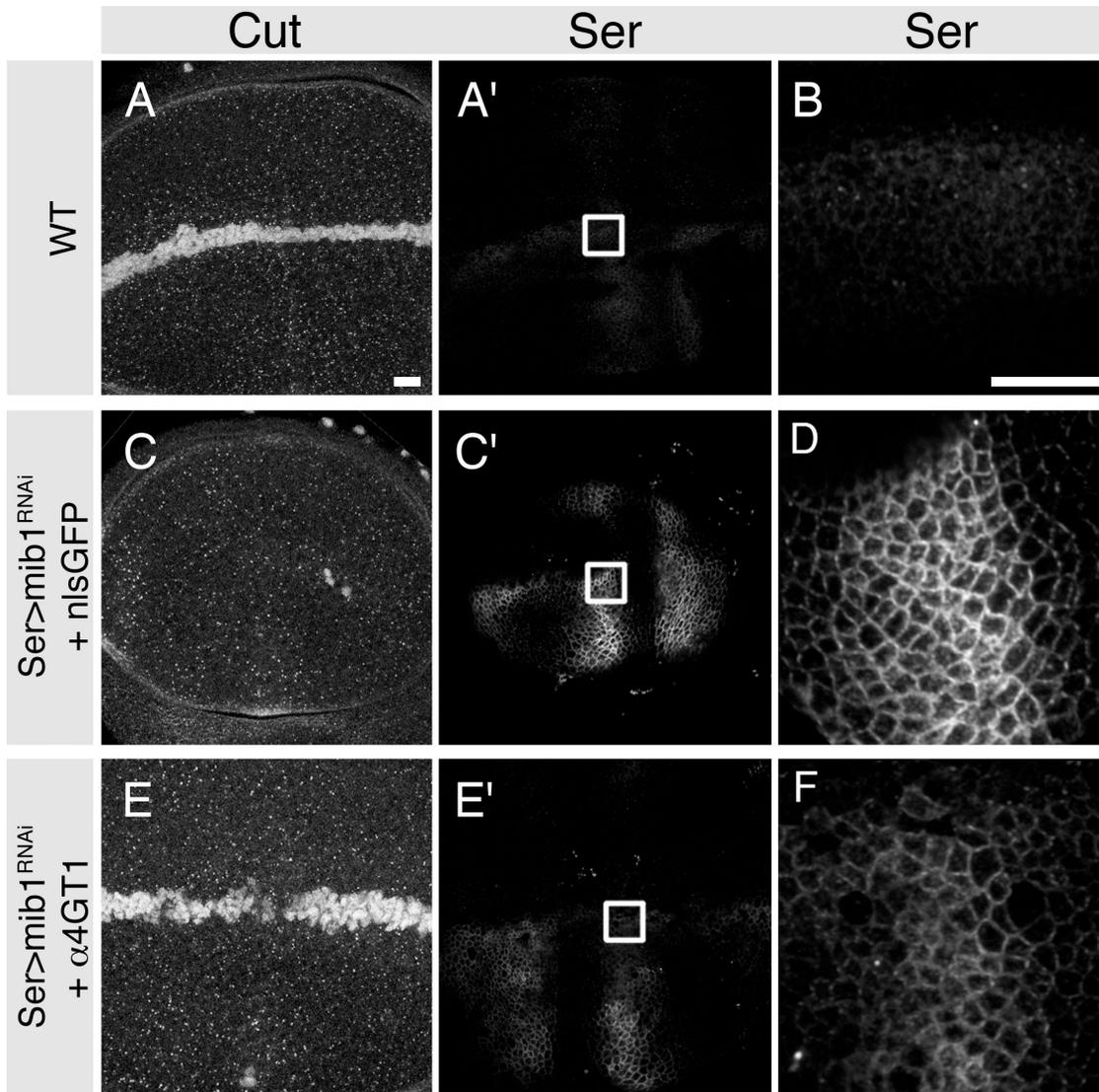


Figure 4. $\alpha 4GT1$ rescued loss of *mib1* defects in Ser accumulation. (A–F) The accumulation of Ser at the apical cortex of the cells and wing margin formation (using Cut as a marker) were examined in wild-type (WT; A–B), *UAS-nlsGFP/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^{UAS-mib1}RNAi/+* (*Ser > mib1^{RNAi} + nlsGFP*; C–D), and *Ser-Gal4 tub-Gal80^{UAS-mib1}RNAi/GS2078* (*Ser > mib1^{RNAi} + $\alpha 4GT1$* ; E–F) wing imaginal cells. High magnification views of the areas boxed in A', C', and E' are shown in B, D, and F, respectively. (A', B, C', D, E', and F) Single apical sections of stacks acquired using parameters adjusted to the high intensity signals measured in D are shown. These settings account for the low Ser signal in B. (A–B) Wild-type controls are shown. (A) Wing margin cells are specified as revealed by Cut expression along the dorsal–ventral boundary. (B) Low levels of Ser were detected at apical sections (fluorescence signal intensity = 1 ± 0.2 arbitrary units; $n = 3$). (C–D) RNAi-mediated inactivation of *mib1* resulted in increased Ser levels [D; fluorescence signal intensity = 16 ± 2.5 ; $n = 3$] and loss of wing margin (C). (E–F) Overexpression of $\alpha 4GT1$ rescued the *mib1RNAi defects in Ser accumulation [F; fluorescence signal intensity = 3.4 ± 0.5 ; $n = 3$] and restored wing margin formation and pouch growth (E). Our quantification clearly indicates that the level of apical Ser was increased upon reduction of Mib1 activity in *mib1 RNAi cells and that expression of $\alpha 4GT1$ counteracts this effect. Bars, 10 μ m.**

standard GSLs. Extracts prepared from $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ double mutants exhibited an accumulation of N4 and a loss of N5, indicating that $\alpha 4GT1$ and/or $\alpha 4GT2$ is required in vivo to synthesize N5 from N4 as previously proposed (Wandall et al., 2005; Chen et al., 2007; Stolz et al., 2008). Conversely, overexpression of $\alpha 4GT1$ resulted in a loss of N4 and an accumulation of N5 (Fig. 7 D), further indicating that $\alpha 4GT1$ is a limiting enzyme. As previously reported, N1 and N2 accumulated in *egh* and *brn* mutants, respectively, whereas N4 and N5 were not detected. Overexpression of $\alpha 4GT1$ in *egh* and *brn* mutant larvae did not significantly change the composition in GSLs of these mutants (Fig. 7 D), which is consistent with Egh and Brn being

required to produce the N4 substrate of $\alpha 4GT1$. Together, these data indicate that $\alpha 4GT1$ modifies N4 to form N5.

GSL modification by $\alpha 4GT1$ is required to rescue *mib1* defects

The aforementioned data raise the possibility that loss of N4 and/or accumulation of N5 rescue inhibition of DI and Ser endocytosis caused by dominant-negative versions or RNAi-mediated down-regulation of *mib1* and *neur*. To test whether GSL modification is necessary for this activity of $\alpha 4GT1$, we examined whether the suppression of Mib1 inhibition by $\alpha 4GT1$ required the presence of GSLs produced by Egh and Brn. We

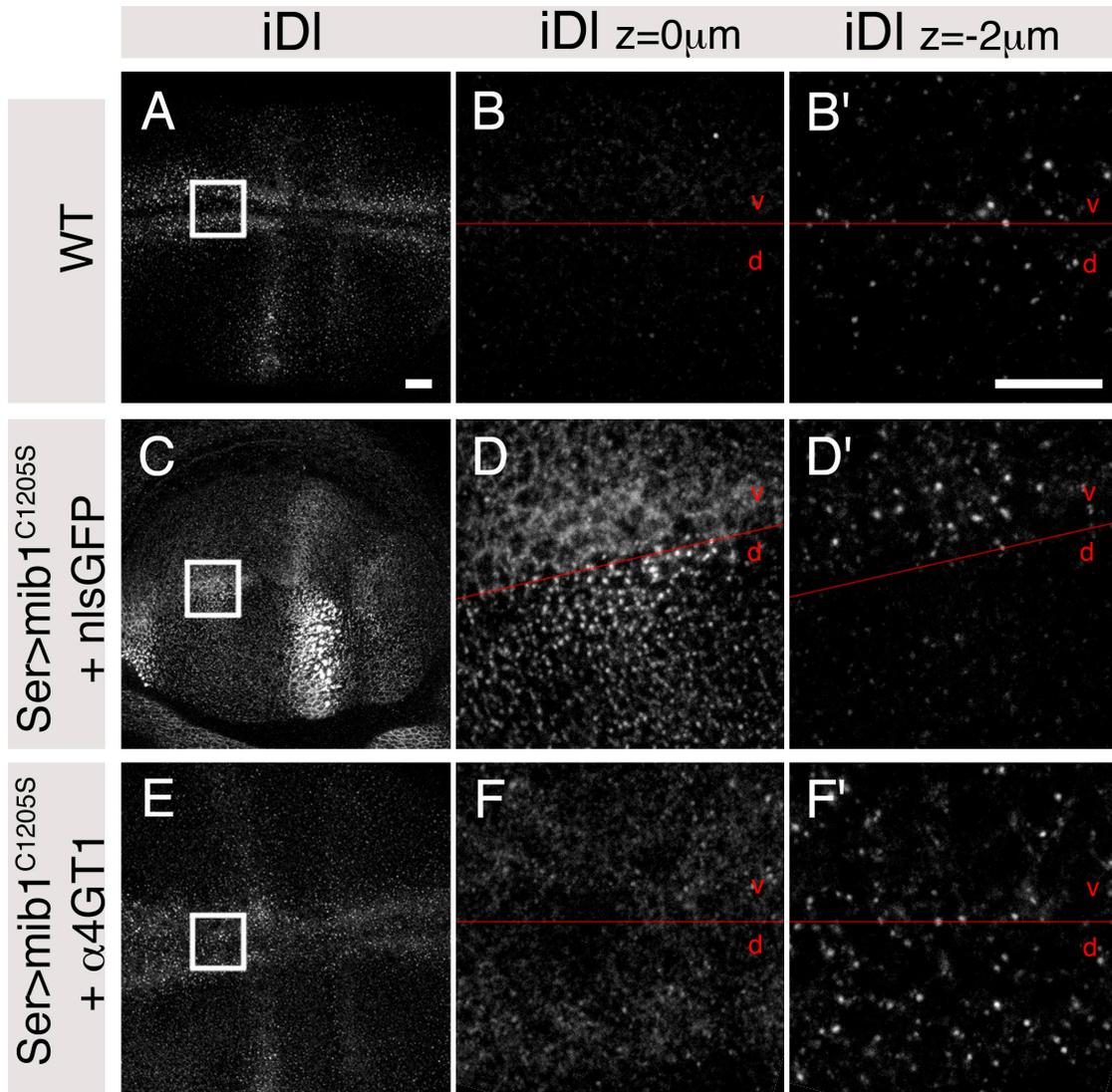


Figure 5. $\alpha 4GT1$ rescued the endocytosis of DI blocked by $Mib1^{C1205S}$. The endocytosis of DI was monitored in wing imaginal discs using an antibody uptake assay in wild-type (A–B'), $UAS-nlsGFP/UAS-mib1^{C1205S}$, $Ser-Gal4\ tub-Gal80^{ts}/+$ ($Ser > mib1^{C1205S} + nlsGFP$; C–D'), and $UAS-mib1^{C1205S}/+$, $Ser-Gal4\ tub-Gal80^{ts}/GS2078$ ($Ser > mib1^{C1205S} + \alpha 4GT1$; E–F'). The approximate position of the dorsal (d)–ventral (v) boundary is indicated in red. (A–B') In wild-type discs, iDI was detected in subapical sections (B') in both dorsal and ventral cells that express DI (Fig. 3 A). (C–D') Expression of $Mib1^{C1205S}$ in dorsal cells using $Ser-GAL4$ inhibited the endocytosis of DI (D'). In these cells, dots of DI were only detected in apical sections (D). This staining is very similar to the one seen in cell surface staining experiments (Fig. S3), indicating that $Mib1^{C1205S}$ inhibits the internalization of DI. iDI was only seen in the ventral cells (D') that express $Mib1^{C1205S}$ later and at a lower level (Fig. 1 A). (E–F') Expression of $\alpha 4GT1$ restored the endocytosis of DI. (F') iDI was detected in both ventral and dorsal cells. (F) Only weak cell surface staining was observed. High magnification views of boxed areas shown in A, C, and E are shown in B and B', D and D', and F and F', respectively. Bar, 10 μm .

found that overexpression of $\alpha 4GT1$ did not suppress the *mib1* RNAi-mediated wing margin phenotypes in the absence of *egh* activity and that suppression by $\alpha 4GT1$ was significantly reduced in *brn* mutant discs (Fig. 7, E–M). These data support the notion that modification of N4 by $\alpha 4GT1$ is required to rescue a partial loss of *mib1* activity. Loss of N4 is not sufficient per se to rescue inhibition of *Mib1* because the *mib1* RNAi-mediated wing margin phenotype is not suppressed in *egh* and *brn* mutants that do not accumulate N4 (Fig. 7 D). Alternatively, accumulation of N5 may compensate for a partial loss of *Mib1* activity. Consistent with this interpretation, a Gene Search line inserted 2.5 kb 5' to the $\beta 4$ -GalNAc-TA gene was also isolated as a dominant suppressor in our genetic screen, raising the pos-

sibility that increased N4 and/or N5 levels as a result of $\beta 4$ -GalNAc-TA overexpression also suppressed the $Mib1^{C1205S}$ -induced defects. Whether accumulation of N5 is actually sufficient to rescue inhibition of *Mib1* remains to be tested.

A conserved GSL-binding motif (GBM) in DI and Ser

The aforementioned data raise the possibility that N5 positively regulates the endocytosis of Notch ligands, at least when the function of *Mib1* is compromised. Various mechanisms, direct and indirect, could potentially underlie this positive regulation, including mechanisms involving a direct interaction between GSLs and the Notch ligands. As a first step to test this hypothe-

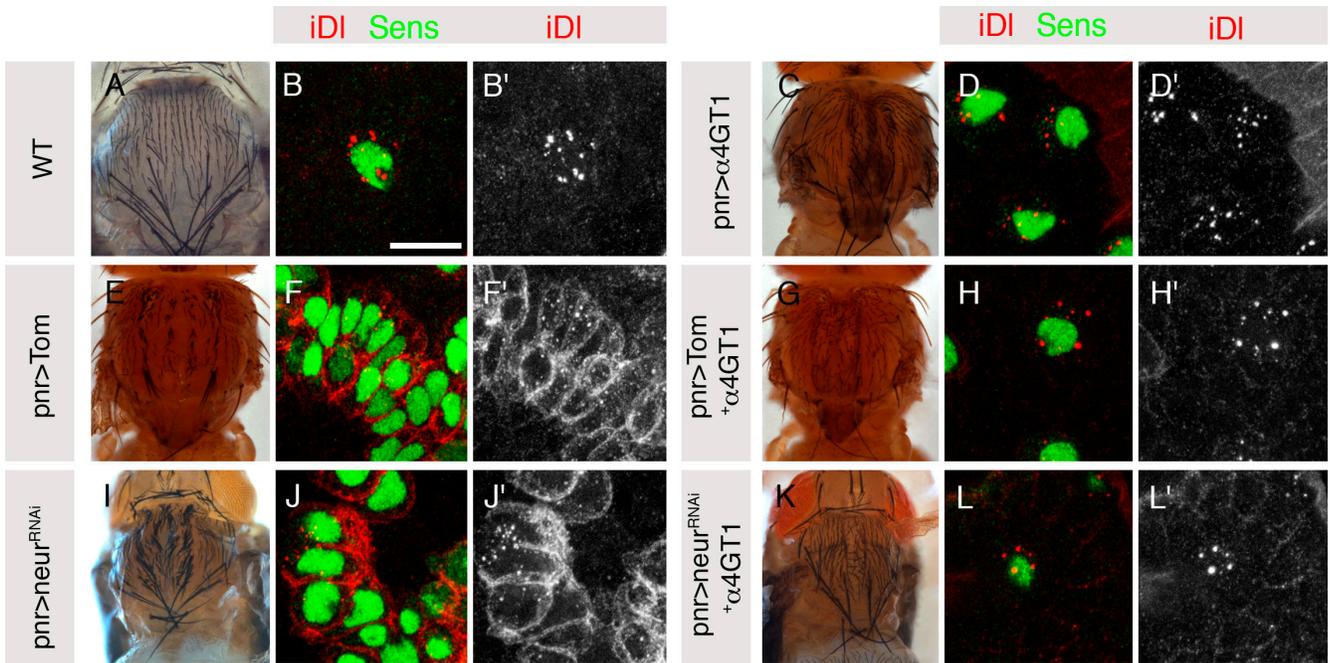


Figure 6. $\alpha 4GT1$ restored the Neur-dependent endocytosis of DI in SOPs. (A–L') The endocytosis of DI (iDI in red) was monitored in SOPs (marked by Senseless [Sens] in green) using an antibody uptake assay in pupae of the following genotypes: wild-type (WT; A–B'); *GS2078/+; pnr-GAL4 tub-Gal80^{ts}/+* (*pnr> $\alpha 4GT1$* ; C–D'); *UAS-Tom/+; pnr-GAL4 tub-Gal80^{ts}/+* (*pnr > Tom*; E–F'); *UAS-Tom/GS2078; pnr-GAL4 tub-Gal80^{ts}/+* (*pnr > Tom + $\alpha 4GT1$* ; G–H'); *UAS-neur^{RNAi}/+*; *pnr-GAL4 tub-Gal80^{ts}* (*pnr > neur^{RNAi}*; I–J'); and *UAS-neur^{RNAi}/GS2078; pnr-GAL4 tub-Gal80^{ts}* (*pnr > neur^{RNAi} + $\alpha 4GT1$* ; K–L'). (A–D') Expression of $\alpha 4GT1$ did not detectably affect the endocytosis of DI in SOPs (D and D') and did not significantly change bristle density (C). (E–H') Inhibition of Neur by Tom blocked DI endocytosis (F and F') and resulted in a very strong neurogenic phenotype (E) with too many SOPs being specified (F). Expression of $\alpha 4GT1$ restored both DI endocytosis (H and H') and proper SOP specification (G and H). (I–J') RNAi-mediated down-regulation of *neur* strongly inhibited DI endocytosis (J and J') and resulted in a strong neurogenic phenotype (I) with an excess of SOPs (J'). Expression of $\alpha 4GT1$ restored both DI endocytosis (H and H') and suppressed the *neur* RNAi bristle phenotype (G and H). Bar, 10 μ m.

sis, we searched for potential GBMs in the extracellular domain of DI and Ser using an in silico approach (Mahfoud et al., 2002; Fantini et al., 2006). A putative GBM was predicted in the N2 domain of DI and Ser (Fig. 8 A). This predicted GBM contains a conserved Trp residue flanked by turn-inducing and polar amino acid residues, suggesting that it could belong to a solvent-exposed hairpin structure and, therefore, interact with the sugar head group via a CH- π stacking mechanism (Maresca et al., 2008). These structural features are typical of functional GBMs (Hebbar et al., 2008) and are conserved in vertebrate homologues of DI and Ser (Fig. 8 A).

To test whether these predicted GBMs interact with GSLs, we first used the Langmuir film balance technique with synthetic peptides and GSLs purified from wild-type larvae. In these experiments, a lipid fraction enriched in GSLs was spread at the air–water interface where they readily formed a stable monolayer mimicking the extracellular leaflet of the plasma membrane. Under these conditions, an increase in the surface pressure of the monolayer upon injection of the peptide in the aqueous phase is indicative of insertion of the peptide in the glycolipid monolayer (Mahfoud et al., 2002; Fantini et al., 2006). Upon addition of the Ser and DI GBM peptides, the surface pressure increased to reach a plateau value of 10.8 and 4.4 mN/m, respectively (Fig. 8 B). Replacing the Trp residue by Ala in both peptides abolished interaction, indicating that the Trp residue is essential for the interaction between GSLs and GBM peptides.

We next tested whether the N-terminal part of Ser, Ser[1–288], which includes the N1, N2, and DSL domains, interacts with GSLs in a GBM-dependent manner. Secreted wild-type and GBM mutant versions of Ser, Ser[1–288] and Ser[1–288]^{WA}, respectively, were produced in S2 cells and purified from the culture medium. Ser[1–288] and Ser[1–288]^{WA} interacted similarly with control phosphatidylethanolamine or a neutral lipid fraction prepared from *egh* mutant larvae (Fig. 8, C and D). In contrast, Ser[1–288] interacted more strongly with GSLs prepared from wild-type larvae than Ser[1–288]^{WA} (Fig. 8, C and D). We conclude that the N-terminal part of Ser interacts with GSLs and that this interaction depends on the W180 of the GBM.

To test the potential role of the N4 and N5 GSLs in this interaction, we studied the interaction of Ser[1–288] and Ser[1–288]^{WA} with GSLs prepared either from $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ double mutants, which are high in N4 but low in N5, or from larvae overexpressing $\alpha 4GT1$, which are low in N4 but high in N5. A stronger and specific interaction was upon increased N5 (and decreased N4) levels (Fig. 8 D, compare overexpression of $\alpha 4GT1$ with wild type), whereas depletion in N5 (and accumulation of N4) had no effect (Fig. 8 D, compare $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ with wild type). We conclude that Ser interacts with GSLs via a conserved GBM and that this interaction is sensitive to the levels of N5 and/or N4. These in vitro data suggest that differences in N4 and/or N5 levels within the plasma membrane modulate the endocytosis of DI and Ser via direct GSL–protein interaction.

ROUGH GALLEY PROOF

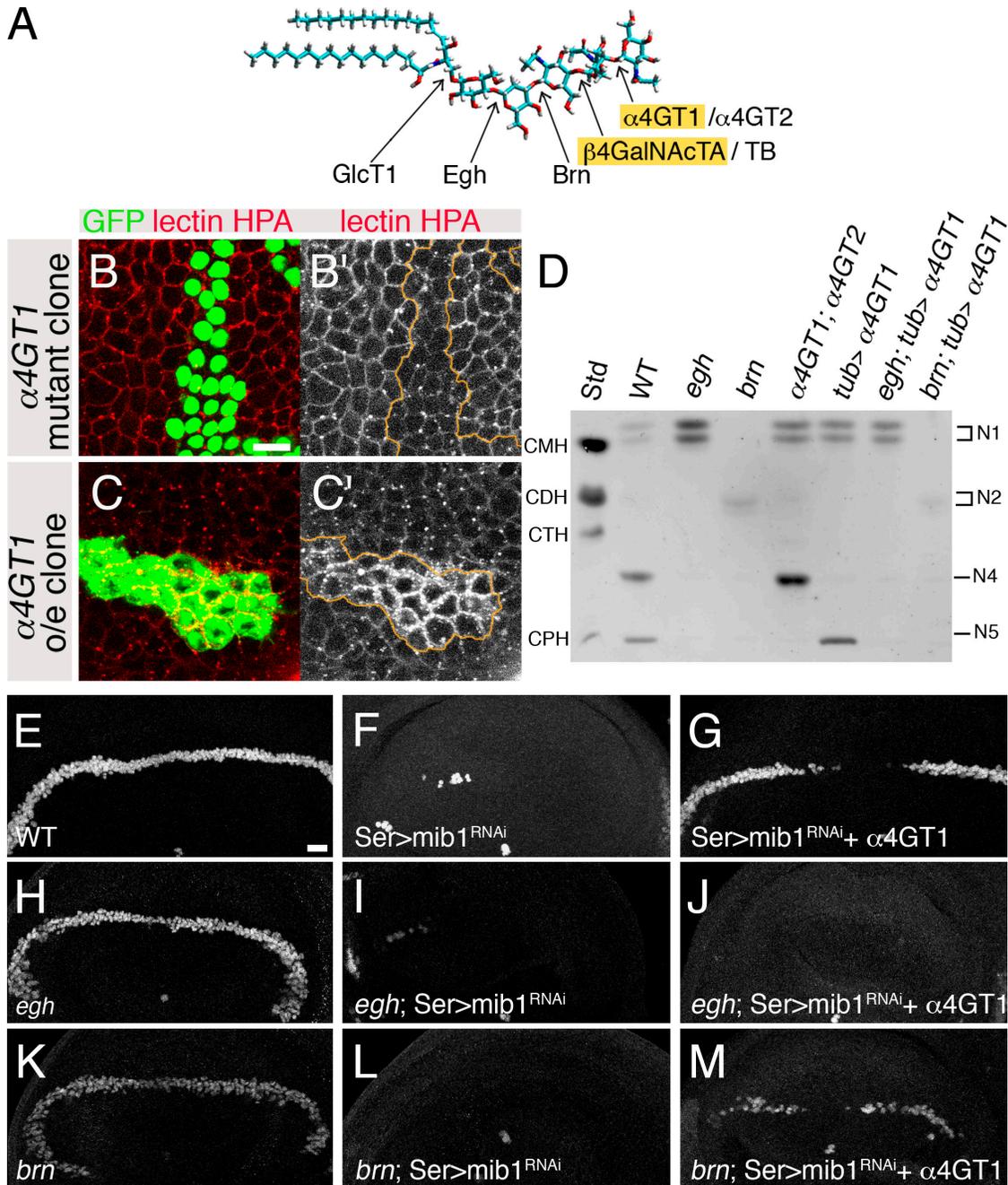
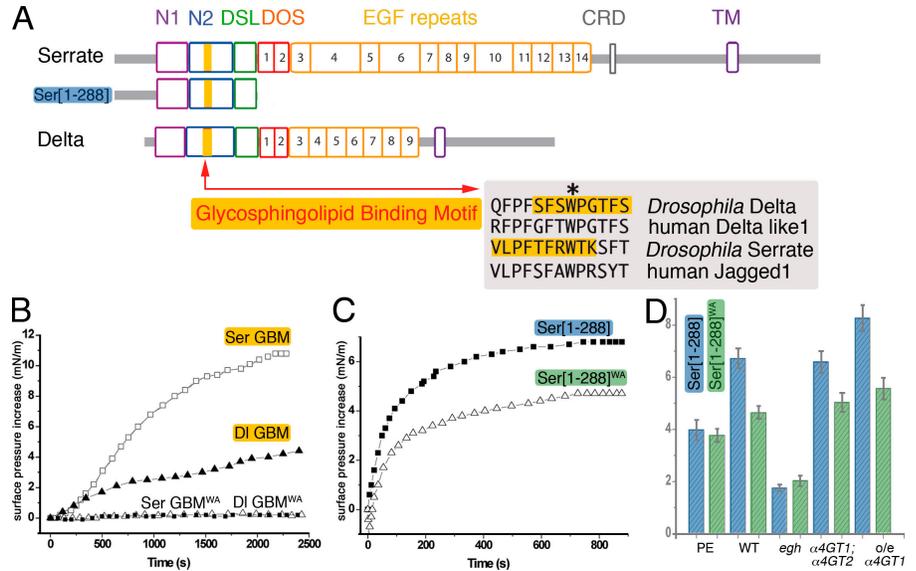


Figure 7. Rescue of *mib1* inhibition by $\alpha 4GT1$ depends on *egh* and *brn* activities. (A) Molecular structure of GalNAc- $\alpha 1$ -4-GalNAc- $\beta 1$ -4-GlcNAc- β -1-3Man- β 1-4Glc- β 1-1Cer or N5. The enzymes acting sequentially in the N5 biosynthetic pathway are indicated below (see Results). The two dominant suppressors identified in our screen are highlighted in yellow. (B–C') Analysis of α -GalNAc distribution in pupal notum epithelial cells using HPA (TRITC-HPA in red). HPA staining was strongly reduced in clones of $\alpha 4GT1$ mutant cells (B and B'); mutant cells are marked by nuclear GFP in green), indicating that $\alpha 4GT1$ is required for α -GalNAc localization at the cell surface. Overexpression (o/e) of $\alpha 4GT1$ in clones (CD8-GFP in green) resulted in increased HPA staining, indicating that $\alpha 4GT1$ is a limiting enzyme for addition of α -GalNAc. (D) HPTLC analysis of GSLs purified from wild-type (WT) and mutant larvae. (lane 1) Standard GSLs: CMH, Cer monohexoside (GlcCer); CDH, Cer dihexoside (LacCer); CTH, Cer trihexoside (Gb3); and CPH, Cer pentahexoside (Forsmann glycolipid). The GSL species detected in larvae extracts (N1, N2, N4, and N5) were identified on the basis of their chromatographic mobility as compared with standard GSLs. (lane 2) Wild type. (lane 3) *egh*^{62D18}/Y. (lane 4) *brn*^{6P6}/Y. (lane 5) $\alpha 4GT1^1$ /Df(2L)7819; $\alpha 4GT2^1$. (lane 6) Overexpression of $\alpha 4GT1$ in wild-type larvae: *tub-GAL4/GS2078*. (lane 7) Overexpression of $\alpha 4GT1$ in *egh* mutant larvae: *egh*^{62D18}/Y; *tub-GAL4/GS2078*. (lane 8) Overexpression of $\alpha 4GT1$ in *brn* mutant larvae: *brn*^{6P6}/Y; *tub-GAL4/GS2078*. (E–M) Rescue of *mib1* inhibition by $\alpha 4GT1$ depends on *egh* and *brn* activities. Wing margin specification (marked by Cut) was examined in wild-type (E), Ser > *mib1*^{RNAi} + nlsGFP (F), Ser > *mib1*^{RNAi} + $\alpha 4GT1$ (G), *egh*^{62D18}/Y (H), *egh*^{62D18}/Y; Ser > *mib1*^{RNAi} + nlsGFP (I), *egh*^{62D18}/Y; Ser > *mib1*^{RNAi} + $\alpha 4GT1$ (J), *brn*^{6P6}/Y (K), *brn*^{6P6}/Y; Ser > *mib1*^{RNAi} + nlsGFP (L), and *brn*^{6P6}/Y; Ser > *mib1*^{RNAi} + $\alpha 4GT1$ (M) wing discs. Zygotic loss of *egh* and/or *brn* did not significantly alter the expression of Cut at the wing margin (E, H, and K) and did not enhance the Ser > *mib1*^{RNAi} phenotype (F, I, and L). In the absence of *egh* activity, $\alpha 4GT1$ expression failed to restore wing margin specification (J) as it did in wild-type discs (G). (M) Suppression by $\alpha 4GT1$ was strongly reduced in *brn* mutant discs. The partial suppression seen in *brn* mutants may result from maternally provided *brn* gene products. Alternatively, *egh* may have a *brn*-independent function in this tissue. Bars, 10 μ m.

ROUGH GALLEY PROOF

Figure 8. **Identification of a conserved GBM.**

(A) Schematic representation of the structure of DI and Ser [adapted from Parks et al., 2006]. The domain structure of Ser[1–288] is also indicated. The potential GBM detected in the N2 domain of DI and Ser appears in yellow. This GBM is conserved in mammals: the sequences of human DI-like 1 and Jagged1 are aligned with the GBM of *Drosophila* DI and Ser. The sequences of the synthetic peptides used in B and C are boxed in yellow. The Trp (W) residue shown in B required for interaction with GSLs is indicated with an asterisk. DSL, DI/Ser/LAG-2; DOS, DI- and OSM-11- like proteins; CRD, cysteine-rich domain; TM, transmembrane domain. (B) Analysis of GBM–GSL interactions. Synthetic peptides corresponding to the GBM of Ser and DI interacted with total GSLs extracted from wild-type larvae. Interactions were quantitatively measured using the Langmuir film balance technique. The conserved Trp residue is essential for these interactions. The following peptides were studied: Ser GBM (open squares; VLPFTFRWTK), Ser GBM^{WA} (closed squares; VLPFTFRATK), DI GBM (closed triangles; SFSWPGTFS), and DI GBM^{WA} (open triangles; SFSAPGTFS). (C and D) Analysis of Ser–GSL interactions. Interactions of the Ser[1–288] (closed squares in C; blue bars in D) and Ser[1–288]W180A (open triangles in C; green bars in D) proteins secreted from S2 cells with phosphatidylethanolamine (PE) and total GSLs extracted from wild-type, *egh*, $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ double-mutant, and *tub-GAL4 UAS- $\alpha 4GT1$* (overexpressed $\alpha 4GT1$) larvae were quantitatively measured using the Langmuir film balance. The binding kinetics are shown in C, and the values of the maximal surface pressure increases are given in D. (D) Ser[1–288] and Ser[1–288]^{WA} similarly interacted with PE and neutral lipids prepared from *egh* mutant larvae. This indicates that the N-terminal part of Ser interacts in a GBM-independent manner with lipid monolayers in this assay. In contrast, Ser[1–288] interacted more strongly than Ser[1–288]^{WA} with total GSLs extracted from wild-type, $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ double-mutant, and *tub-GAL4 UAS- $\alpha 4GT1$* larvae, indicating that the N-terminal part of Ser interacts in a GBM-dependent manner with GLSs. Moreover, a stronger and GBM-dependent interaction correlated with high levels of N5 (and low levels of N4) in overexpressed $\alpha 4GT1$ larvae.



[AQ5]

Discussion

In this study, we identify $\alpha 4GT1$ as a positive, nonessential regulator of Notch signaling in *Drosophila*. Expression of $\alpha 4GT1$ suppressed the phenotypes associated with the inhibition or a partial loss of *neur* and/or *mib1* activities in at least two developmental contexts. Conversely, the loss of $\alpha 4GT1$ function enhanced a partial loss of *Notch* activity. Although the complete loss of $\alpha 4GT1$ activity has no detectable phenotypic consequences, these genetic interactions indicate that $\alpha 4GT1$ plays a positive role in Notch signaling in *Drosophila*.

Several lines of evidence indicate that this function of $\alpha 4GT1$ involves a specific modification of GSLs. First, HPA lectin staining experiments showed that $\alpha 4GT1$ is both necessary and sufficient for the addition of terminal α -GalNAc at the cell surface of imaginal cells. Second, chromatography analysis indicated that $\alpha 4GT1$ is both necessary and sufficient for the biosynthesis of the N5 GSL from its N4 precursor. Third, suppression of the partial loss of function *mib1* phenotype by $\alpha 4GT1$ required the activity of the glycosyltransferases Egh and Brn. Because extension of the Man β 1-4Glc β 1-Cer core by Egh and Brn produces a terminal lacidNAc that, despite intensive analyses of glycoproteins (North et al., 2006), has only been found on GSLs (Seppo et al., 2000), we conclude that synthesis of N5 from its precursor N4 underlies the suppression of the *mib1*-dependent defects by $\alpha 4GT1$.

The in vivo functions of GSLs are not well understood (Degroote et al., 2004; Sillence, 2007). Several studies indicate that GSLs play a role in modulating the signaling activity of cell surface receptors. For instance, GSLs have been shown to

negatively regulate the signaling activity of the EGF receptor (EGFR), and this negative regulation appears to involve a direct interaction between the EGFR and a specific GSL, GM3 (Yoon et al., 2006). Specific GSLs have also been implicated in caveolar endocytosis and $\beta 1$ -integrin signaling (Sharma et al., 2004; Singh et al., 2007). In *Drosophila*, genetic analyses have indicated that the activities of Egh and Brn are required for both epithelium integrity and planar transport of an EGFR ligand (Goode et al., 1996; Wandall et al., 2003; Pizette et al., 2009). The *egh* and *brn* genes have also been suggested to regulate neurogenesis in the early embryo (Goode et al., 1996). However, our analysis of the *brn* mutant phenotypes indicated that this developmental defect does not result from defective Notch signaling (unpublished data). The *Caenorhabditis elegans* homologues of *egh* and *brn*, *bre-4*, and *bre-5* act as suppressors of a gain of function allele of the Notch family receptor gene *lin-12* genes (Griffitts et al., 2005; Katic et al., 2005). Although the molecular basis underlying these genetic interactions is not known, *bre-5* was shown to act in a non-cell-autonomous manner, raising the possibility that GSLs modulate the signaling activity of the Lin-12 ligands. Although the *bre-4* and *bre-5* genes play a positive role in Lin-12 signaling in *C. elegans*, these two genes are not essential in *C. elegans* (Griffitts et al., 2005; Katic et al., 2005). This situation is very reminiscent of the nonessential modulatory role of *Drosophila* $\alpha 4GT1$ uncovered in this study. Thus, GSLs appear to play a conserved modulatory role in Notch signaling. Of note, a nonessential role has also been proposed for phospholipids: mutations in the *Drosophila phosphocholine cytidylyltransferase 1* gene reduced phosphatidylcholine and increased phosphatidylinositol levels

at the plasma membranes and enhanced Notch hypomorphic phenotypes (Weber et al., 2003).

What is the role of GSLs in Notch signaling? Our biochemical and genetic interaction experiments indicate that high N5 levels can compensate for reduced levels of Neur and/or Mib1 activity. In several experimental situations, i.e., inhibition of Mib1 by dominant-negative Mib1 in wing imaginal cells, inhibition of Neur in notum cells by Tom or dominant-negative Neur, partial loss of *neur* activity in notum cells using RNAi, we observed that $\alpha 4GT1$ expression restored normal levels of DI endocytosis. Therefore, we propose that high levels of N5 positively regulate the endocytosis of DI. However, this role of N5 has so far only been observed in sensitized contexts in which DI endocytosis is inhibited. In particular, no increase in *neur*-dependent endocytosis of DI was seen in SOPs overexpressing $\alpha 4GT1$. The restoration of proper Ser localization by $\alpha 4GT1$ in cells with reduced *mib1* activity very likely reflects a similar role of N5 on the endocytosis of Ser. The role proposed in this study for GSLs in Notch ligand endocytosis is entirely consistent with the nonautonomy observed for *bre-5* in *C. elegans* (Katic et al., 2005). It is also consistent with the localization of mammalian DI-like 1 in detergent-resistant membranes that are enriched in cholesterol and sphingolipids (Heuss et al., 2008).

This in turn raises the question of how GSLs influence the endocytosis of DI and Ser. A first possibility is that high levels of N5 GSLs have a general effect on endocytosis. However, this view is not supported by our observation that the uptake of FM4-64 did not appear significantly changed upon $\alpha 4GT1$ overexpression. A second possibility is that $\alpha 4GT1$ expression indirectly results in increased enzymatic activity of the E3 ubiquitin ligases Neur and Mib1. A third possibility is that changes in GSL composition of the plasma membrane modify the distribution and organization of lipids, thereby promoting the organization of specific nanodomains. Accordingly, $\alpha 4GT1$ expression could modify the distribution of specific cargoes, including DI and Ser, at the plasma membrane. For instance, clustering of DI and Ser within N5-containing nanodomains might facilitate their endocytosis, thus signaling activity. Consistent with this view, one proposed function of GSLs is to promote endocytosis (Sharma et al., 2004). This view is also supported by our identification of a conserved GBM present in both DI and Ser that interacts in vitro with GSLs. Although the function of this GBM remains to be tested in vivo, we note that four different Alagille syndrome misense mutations in the human *Jagged1* gene map to the 10-amino acid sequence of the GBM (Crosnier et al., 1999; Röpke et al., 2003). Furthermore, the strength of the interaction between Ser and GSLs depends on N4 and/or N5 levels. Specifically, lipid monolayers enriched in N5 appeared to interact in vitro more strongly with the N-terminal extracellular domain of Ser in a GBM-dependent manner. Finally, we speculate that this role of GSLs in endocytosis cannot bypass the strict requirement for ubiquitination of the Notch ligands because expression of $\alpha 4GT1$ did not suppress the *mib1*-null phenotype. Whether DI and Ser interact in vivo with GSLs, either within the same cell or across the intercellular space of neighboring cells, and whether this interaction regulates the

endocytosis and activity of DI and Ser remain to be investigated. In summary, our study uncovers a novel regulatory but non-essential function of GSLs in *Drosophila* and establishes a new functional link between the E3 ubiquitin ligase-dependent endocytosis of DI and Ser and specific GSLs.

Materials and methods

Flies

The GS2078 line was generated by the *Drosophila* Gene Search Project (<http://gsdb.biol.metro-u.ac.jp/~dclust/index.html>). We identified this Gene Search line in a screen for suppression of the wing phenotype induced by the expression of Mib1^{C12055} in *Ser-GAL4 tub-GAL80^S UAS-mib1^{C12055}* flies. The *Ser-GAL4 tub-GAL80^S* and *pnr-GAL4 tub-GAL80^S* chromosomes were obtained by recombining previous transgenes and enhancer trap insertions (<http://flybase.org/>). *UAS-mib1^{C12055}* flies were described previously (Le Borgne et al., 2005b). All crosses involving *Ser-GAL4 tub-GAL80^S* and *pnr-GAL4 tub-GAL80^S* were at 25°C, and the progeny was transferred at 28°C at the first/second instar larval stage to allow for postembryonic GAL4-dependent expression.

The Df(2L)7819 deletion was generated by FLP/FRT recombination as described previously (<http://www.drosdel.org.uk/ddelements.html>; Golic and Golic, 1996). It deletes the 23,984 nucleotide located between the P-elements 5HA-2924 and CB-5583-3. The structure of Df(2L)7819 was verified by PCR amplification of the recombined P-element. The $\alpha 4GT1^1$ allele was generated by imprecise excision of the 5HA-2924 P-element. The breakpoints of the small deletion associated with this allele were determined by sequencing a PCR fragment amplified from genomic DNA prepared from $\alpha 4GT1^1$ /Df(2L)7819 flies.

The $\alpha 4GT1^2$ allele was selected by the *Drosophila* Tilling project (Cooper et al., 2008), and the molecular lesion was verified by sequencing. The EP797 line was obtained from the Szeged Stock Center. The $\alpha 4GT1^1$ allele was present in the strain sequenced by the *Drosophila* Genome Project. The presence of the roo element was verified by genomic PCR experiments.

mib1 mutant alleles were described previously (Le Borgne et al., 2005b). The *mib1²/mib1³* is a null trans-heterozygous combination, whereas the *mib1³/mib1⁴* represents a hypomorphic combination. The *UAS-mib1^{RNAi}* was obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (line ID27525). The *UAS-neur^{RNAi}* line was obtained from R. Ueda (<http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp>). The *egh^{62D18}* and *brn^{1.6P6}* mutations were described previously (Goode et al., 1996; Wandall et al., 2003). All other mutations and fly stocks used in this study are described in FlyBase (<http://flybase.org/>).

The following transgenes were produced in this study: *UAS- $\alpha 4GT1$* , *UAS- $\alpha 4GT2$* , *UAS-YFPmib1^{C12055}*, and *UAS-YFPneur^{C7015}* (cloning details for these constructs are available upon request). Transgenic flies were generated via standard P-element transformation.

Mitotic clones were induced in first and second instar larvae using a 45-min heat shock at 36.5°C. *mib1²* clones were generated in *hs-flp tub-Gal4 UAS-GFP*; *FRT2A mib1²/tub-Gal80 FRT2A* larvae. Clones of DI Ser mutant cells expressing Mib1^{C12055} were generated in *hs-flp tub-Gal4 UAS-GFP/UAS-mib1^{C12055}*; *FRT82B Df^{rev10} Ser^{Rx82}/tub-Gal80 FRT82B* larvae. Control clones were generated in *hs-flp tub-Gal4 UAS-GFP/UAS-mib1^{C12055}*; *FRT82B/tub-Gal80 FRT82B* larvae. $\alpha 4GT1$ clones were generated in *hs-flp tub-Gal4 UAS-GFP*; *FRT40A Df(2L)7819/tub-Gal80 FRT40A* larvae. $\alpha 4GT1$ overexpression clones were generated in *hs-flp tub-Gal4 UAS-mCD8-GFP/GS2078*; *FRT82B/tub-Gal80 FRT82B*.

Immunostainings and endocytosis assays

Dissection and antibody staining were performed using standard procedures. The following antibodies were used: mouse anti-Cut (2B10 ascite; 1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]), rat anti-Ser (1:1,000; provided by K. Irvine, Rutgers University, Piscataway, NJ; Papayannopoulos et al., 1998), mouse anti-DI (C594.9B; 1:1,000; DSHB; Kooh et al., 1993), mouse anti-Notch (C458.2H; 1:1,000; DSHB; Fehon et al., 1991), rabbit anti-Patj (1:500; provided by K. Choi, Baylor College, Houston, TX; Bhat et al., 1999), rat anti-E-Cad2 (1:500; DSHB; Oda et al., 1994), rat anti-Crumbs (1:1,000; provided by U. Tepass, Toronto University, Toronto, Ontario, Canada; Tepass and Knust, 1993), guinea pig anti-Senseless (1:2,000; provided by H. Bellen, Baylor College; Nolo et al., 2000), and rabbit anti-Mib1 (1:200; Le Borgne et al., 2005b). Anti-Ser, -DI, and -N antibodies recognized extracellular epitopes. All secondary

[AQ3]

antibodies were Cy2-, Cy3-, and Cy5-coupled antibodies obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

Surface staining experiments were performed at 4°C. Third instar larvae wing discs were dissected at 4°C in Schneider (S2) medium and incubated for 2 h at 4°C with anti-Dl (C594.9B concentrate; 1:50; DSHB) and anti-Ser (1:50; provided by K. Irvine) in S2 medium. Discs were rinsed four times for 5 min at 4°C with S2 medium and fixed for 30 min at 4°C in 4% PFA. Lectin HPA-TRITC (1:100; Sigma-Aldrich) surface staining was performed at 4°C with no detergent.

Anti-Dl uptake assays in pupal nota were performed as described previously (Le Borgne and Schweisguth, 2003). Pupal nota were dissected in Schneider's *Drosophila* medium (S2 medium; Invitrogen) and directly incubated for 8 min at 25°C with mouse monoclonal anti-Dl antibody C594.9B (concentrate from the DSHB; 1:50) that recognizes the extracellular portion of Dl. After rapid medium changes, nota were fixed and processed for immunostainings.

Anti-Dl uptake assays in wing imaginal discs were performed as described previously (Le Borgne et al., 2005b). Dissected discs were incubated with anti-Dl antibody C594.9B (concentrate from the DSHB; 1:50) at 4°C for 2 h. After rapid medium changes, discs were incubated in S2 medium without antibodies for 30 min at 25°C. Discs were fixed and processed for immunostainings. 50 µg/ml FM4-64FX (Invitrogen) uptake assays were performed as described for wing imaginal discs.

Secondary antibody staining followed standard protocols. Immunofluorescent preparations were mounted in 4% N-propyl-gallate and 80% glycerol and analyzed using confocal microscopes (SP2 and SPE; Leica) with 63x NA 1.3 and 100x NA 1.4 objectives (HCX Plan Apo CS; Leica). All high magnification views in Figs. 3–5, S2, and S3 are single confocal sections, whereas low magnification views in Figs. 1, 3–6, S2, and S3 are maximal projections of selected sections from confocal stacks. Wings and nota were mounted in Hoyer's medium and photographed using a microscope (AZ100; Carl Zeiss, Inc.) or a microscope (DMRX2; Leica) equipped with an FC420 camera. ImageJ (National Institutes of Health) and Adobe softwares were used to prepare the figures.

[AQ4]

GSL extraction

GSLs were extracted from frozen larvae as described previously (Wandall et al., 2005). 1 g frozen third instar larvae was thawed and homogenized (micropilon; Eppendorf) in 1.5 ml solvent A (2-isopropanol/hexane/water; 55:25:20 vol/vol/vol). The homogenate was centrifuged for 10 min at 2,000 rpm (GR-412; Jouan), and the supernatant was removed and kept. This step was repeated with 1.5 ml solvent B (chloroform/methanol; 1:1 vol/vol), 1.5 ml solvent A, and finally 1.5 ml solvent B. The four supernatant fractions (crude lipid extracts) were combined, evaporated under a nitrogen flux, and resuspended in chloroform/methanol (2:1 vol/vol) at a lipid concentration of 1 mg/ml. The extracts were evaporated, resuspended in 5 ml methanol containing 0.1 M NaOH, and incubated for 1 h at 37°C under agitation to remove most glycerolipid ester species (mild alkaline hydrolysis). The samples were dried by evaporation and re-extracted in chloroform/methanol (2:1 vol/vol). Neutral GSLs were finally purified on a column (DEAE-Sephadex A-25; Sigma-Aldrich), eluted with chloroform/methanol/water (30:60:8 vol/vol/vol), and analyzed by high performance thin layer chromatography (HPTLC) using silica gel 60 HPTLC plates (Merck) in chloroform/methanol/water (60:35:8 vol/vol/vol) as described previously (Fantini et al., 1993). The HPTLC plates were sprayed with orcinol and heated at 110°C for GSL detection. Standard GSLs were purchased from Matreya except for the Forssmann glycolipid (GalNAc- α 1-3-GalNAc- β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer), which was purified from human erythrocytes.

Peptide–GSL interaction

Synthetic peptides (purity >95%) were purchased from Eurogentec. The Ser[1–288] and Ser[1–288]W180A proteins were produced in S2 cells transfected with the pMT-Ser[1–288] and pMT-Ser[1–288]W180A (these plasmids are derivatives by PCR cloning from the pMT-WB-Ser/AP plasmid described in Xu et al., 2007; cloning details are available upon request). S2 cells were grown in 500 ml serum-free Insect Express medium (Invitrogen) and were induced with 5 µM cadmium for 7 d. Secreted 6xHis-tagged proteins were purified using a metal affinity resin (TALON; Takara Bio Inc.), filtered using a column (Superdex 75; GE Healthcare), and concentrated in PBS to 1 mg/ml using a 3-kD column (Amikon).

Surface pressure measurements revealing peptide–GSL and protein–GSL interactions were studied as described previously (Fantini et al., 2006) by the Langmuir film balance technique with a fully automated microtensiometer (μ TROUGH SX; Kibron Inc.). All experiments were per-

formed in a controlled atmosphere at 20 ± 1°C. Monomolecular films of the indicated lipids were spread on pure water subphases (800 µl vol) from chloroform/methanol (1:1 vol/vol). After spreading of the film, 5 min was allowed for solvent evaporation. The initial surface pressure of these reconstituted monolayers was 12–15 mN/m. Increase in the surface pressure was followed kinetically by real-time surface pressure measurements after injecting the peptide (final concentration of 10 µM) or the Ser[1–288] protein (10 µg/ml) into the aqueous phase underneath the glycolipid monolayer until equilibrium was reached. The maximal surface pressure increase induced by the peptide (expressed in mN/m) is the difference measured between the initial and maximal surface pressure values. The data were analyzed with the FilmWareX program (version 3.57; Kibron Inc.). The accuracy of the system under our experimental conditions was ±0.25 mN/m for surface pressure.

Online supplemental material

Figs. S1–S3 provide additional data on the phenotypes induced by dominant-negative Mib1^{C12055}. Immunostainings in Fig. S1 reveal that Mib1^{C12055} does not perturb the distribution of junctional proteins. Clone analysis in Fig. S2 show that the Mib1-dependent defects in Notch localization require Dl and/or Ser. Cell surface stainings in Fig. S3 show that Dl and Ser localize at the surface of Mib1^{C12055}-expressing cells. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200907116/DC1>.

We thank H. Bellen, P. Bryant, K. Choi, N. Haines, K. Irvine, U. Tepass, R. Ueda, the Bloomington and Szeged Stock Centers, the Vienna *Drosophila* RNAi Center, the *Drosophila* Genomics Resource Center, the *Drosophila* Tilling Project, and DSHB for flies, antibodies, and plasmids. We are particularly thankful to M. Tomaru and M. Yamamoto of the *Drosophila* Genetic Resource Center for the Gene Search lines. We thank O. Beaudouin, C.G. Blavet, L. Couturier, E. Crublet, S. Heuss, M. Keita, E. Kubiacyk, R. Le Borgne, F. Logeat, and V. Mayau for help and advice. We also thank all laboratory members for discussion and comments on the manuscript.

This work was funded by core funding from the Institut Pasteur and Centre National de la Recherche Scientifique and by specific grants from L'Agence Nationale de la Recherche (grant 05-BLAN-0277) and L'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; grant 3415). S.Hamel received doctoral fellowships from the French ministry of education, research, and technology and the ARC.

Submitted: 20 July 2009

Accepted: 25 January 2010

References

- Bardin, A.J., and F. Schweisguth. 2006. Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 10:245–255. doi:10.1016/j.devcel.2005.12.017
- Bhat, M.A., S. Izaddoost, Y. Lu, K.O. Cho, K.W. Choi, and H.J. Bellen. 1999. Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell.* 96:833–845. doi:10.1016/S0092-8674(00)80593-0
- Bray, S.J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:678–689. doi:10.1038/nrm2009
- Chen, W., and D. Casey Corliss. 2004. Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. *Dev. Biol.* 267:361–373. doi:10.1016/j.ydbio.2003.11.010
- Chen, Y.W., J.W. Pedersen, H.H. Wandall, S.B. Levery, S. Pizette, H. Clausen, and S.M. Cohen. 2007. Glycosphingolipids with extended sugar chain have specialized functions in development and behavior of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 306:736–749. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.013
- Cooper, J.L., E.A. Greene, B.J. Till, C.A. Codomo, B.T. Wakimoto, and S. Henikoff. 2008. Retention of induced mutations in a *Drosophila* reverse-genetic resource. *Genetics.* 180:661–667. doi:10.1534/genetics.108.092437
- Crosnier, C., C. Driancourt, N. Raynaud, S. Dhome-Pollet, N. Pollet, O. Bernard, M. Hadchouel, and M. Meunier-Rotival. 1999. Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome. *Gastroenterology.* 116:1141–1148. doi:10.1016/S0016-5085(99)70017-X
- D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster. 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene.* 27:5148–5167. doi:10.1038/ncr.2008.229
- Degroote, S., J. Wolthoorn, and G. van Meer. 2004. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15:375–387. doi:10.1016/j.semcdb.2004.03.007
- Fantini, J., D.G. Cook, N. Nathanson, S.L. Spitalnik, and F. Gonzalez-Scarano. 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immuno-

- deficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2700–2704. doi:10.1073/pnas.90.7.2700
- Fantini, J., N. Garmy, and N. Yahi. 2006. Prediction of glycolipid-binding domains from the amino acid sequence of lipid raft-associated proteins: application to HpaA, a protein involved in the adhesion of *Helicobacter pylori* to gastrointestinal cells. *Biochemistry.* 45:10957–10962. doi:10.1021/bi060762s
- Fehon, R.G., K. Johansen, I. Rebay, and S. Artavanis-Tsakonas. 1991. Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for notch function. *J. Cell Biol.* 113:657–669. doi:10.1083/jcb.113.3.657
- Fortini, M.E. 2009. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell.* 16:633–647. doi:10.1016/j.devcel.2009.03.010
- Golic, K.G., and M.M. Golic. 1996. Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics.* 144:1693–1711.
- Goode, S., M. Melnick, T.B. Chou, and N. Perrimon. 1996. The neurogenic genes egghead and brainiac define a novel signaling pathway essential for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development.* 122:3863–3879.
- Griffitts, J.S., S.M. Haslam, T. Yang, S.F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P.S. Cremer, A. Dell, M.J. Adang, and R.V. Aroian. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science.* 307:922–925. doi:10.1126/science.1104444
- Haines, N., and K.D. Irvine. 2005. Functional analysis of *Drosophila* beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferases. *Glycobiology.* 15:335–346. doi:10.1093/glycob/cwi017
- Hancock, J.F. 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:456–462. doi:10.1038/nrm1925
- Hebbar, S., E. Lee, M. Manna, S. Steinert, G.S. Kumar, M. Wenk, T. Wohland, and R. Kraut. 2008. A fluorescent sphingolipid binding domain peptide probe interacts with sphingolipids and cholesterol-dependent raft domains. *J. Lipid Res.* 49:1077–1089. doi:10.1194/jlr.M700543-JLR200
- Heuss, S.F., D. Ndiaye-Lobry, E.M. Six, A. Israël, and F. Logeat. 2008. The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:11212–11217. doi:10.1073/pnas.0800695105
- Iskratsch, T., A. Braun, K. Paschinger, and I.B. Wilson. 2009. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal. Biochem.* 386:133–146. doi:10.1016/j.ab.2008.12.005
- Itoh, M., C.H. Kim, G. Palardy, T. Oda, Y.J. Jiang, D. Maust, S.Y. Yeo, K. Lorick, G.J. Wright, L. Ariza-McNaughton, et al. 2003. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell.* 4:67–82. doi:10.1016/S1534-5807(02)00409-4
- Katic, I., L.G. Vallier, and I. Greenwald. 2005. New positive regulators of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans* include the BRE-5/Brainiac glycosphingolipid biosynthesis enzyme. *Genetics.* 171:1605–1615. doi:10.1534/genetics.105.048041
- Kooh, P.J., R.G. Fehon, and M.A. Muskavitch. 1993. Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development.* 117:493–507.
- Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137:216–233. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045
- Lai, E.C., F. Roegiers, X. Qin, Y.N. Jan, and G.M. Rubin. 2005. The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development.* 132:2319–2332. doi:10.1242/dev.01825
- Lajoie, P., J.G. Goetz, J.W. Dennis, and I.R. Nabi. 2009. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 185:381–385. doi:10.1083/jcb.200811059
- Le Borgne, R., and F. Schweisguth. 2003. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev. Cell.* 5:139–148. doi:10.1016/S1534-5807(03)00187-4
- Le Borgne, R., A. Bardin, and F. Schweisguth. 2005a. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development.* 132:1751–1762. doi:10.1242/dev.01789
- Le Borgne, R., S. Remaud, S. Hamel, and F. Schweisguth. 2005b. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 3:e96. doi:10.1371/journal.pbio.0030096
- Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327:46–50. doi:10.1126/science.1174621
- Lingwood, D., J. Ries, P. Schwillie, and K. Simons. 2008. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:10005–10010. doi:10.1073/pnas.0804374105
- Mahfoud, R., N. Garmy, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver, and J. Fantini. 2002. Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J. Biol. Chem.* 277:11292–11296. doi:10.1074/jbc.M111679200
- Maresca, M., A. Derghal, C. Carravagna, S. Dudin, and J. Fantini. 2008. Controlled aggregation of adenine by sugars: physicochemical studies, molecular modelling simulations of sugar-aromatic CH-pi stacking interactions, and biological significance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10:2792–2800. doi:10.1039/b802594k
- Müller, R., F. Altmann, D. Zhou, and T. Hennet. 2002. The *Drosophila melanogaster* brainiac protein is a glycolipid-specific beta 1,3N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 277:32417–32420. doi:10.1074/jbc.C200381200
- Nolo, R., L.A. Abbott, and H.J. Bellen. 2000. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell.* 102:349–362. doi:10.1016/S0092-8674(00)00040-4
- North, S.J., K. Koles, C. Hembd, H.R. Morris, A. Dell, V.M. Panin, and S.M. Haslam. 2006. Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos. *Glycoconj. J.* 23:345–354. doi:10.1007/s10719-006-6693-4
- Oda, H., T. Uemura, Y. Harada, Y. Iwai, and M. Takeichi. 1994. A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* 165:716–726. doi:10.1006/dbio.1994.1287
- Papayannopoulos, V., A. Tomlinson, V.M. Panin, C. Rauskolb, and K.D. Irvine. 1998. Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science.* 281:2031–2034. doi:10.1126/science.281.5385.2031
- Parks, A.L., J.R. Stout, S.B. Shepard, K.M. Klueg, A.A. Dos Santos, T.R. Parody, M. Vaskova, and M.A. Muskavitch. 2006. Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. *Genetics.* 174:1947–1961. doi:10.1534/genetics.106.061630
- Pizette, S., C. Rabouille, S.M. Cohen, and P. Théron. 2009. Glycosphingolipids control the extracellular gradient of the *Drosophila* EGFR ligand Gurken. *Development.* 136:551–561. doi:10.1242/dev.031104
- Protzer, C.E., A. Preiss, and A.C. Nagel. 2009. *Drosophila* alpha-1,4-glycosyltransferase (alpha-4GT1) inhibits reaper-mediated apoptosis in the eye. *Cell Tissue Res.* 336:149–158. doi:10.1007/s00441-009-0758-1
- Röpke, A., A. Kujat, M. Gräber, J. Giannakudis, and I. Hansmann. 2003. Identification of 36 novel Jagged1 (JAG1) mutations in patients with Alagille syndrome. *Hum. Mutat.* 21:100. doi:10.1002/humu.9102
- Sanchez, J.F., J. Lescar, V. Chazalet, A. Audfray, J. Gagnon, R. Alvarez, C. Breton, A. Imberty, and E.P. Mitchell. 2006. Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J. Biol. Chem.* 281:20171–20180. doi:10.1074/jbc.M603452200
- Sasaki, N., T. Sasamura, H.O. Ishikawa, M. Kanai, R. Ueda, K. Saigo, and K. Matsuno. 2007. Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells. *Genes Cells.* 12:89–103. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01037.x
- Seppo, A., M. Moreland, H. Schweingruber, and M. Tiemeyer. 2000. Zwitterionic and acidic glycosphingolipids of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Eur. J. Biochem.* 267:3549–3558. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01383.x
- Sharma, D.K., J.C. Brown, A. Choudhury, T.E. Peterson, E. Holicky, D.L. Marks, R. Simari, R.G. Parton, and R.E. Pagano. 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol. Biol. Cell.* 15:3114–3122. doi:10.1091/mbc.E04-03-0189
- Sillence, D.J. 2007. New insights into glycosphingolipid functions—storage, lipid rafts, and translocators. *Int. Rev. Cytol.* 262:151–189. doi:10.1016/S0074-7696(07)62003-8
- Singh, R.D., E.L. Holicky, Z.J. Cheng, S.Y. Kim, C.L. Wheatley, D.L. Marks, R. Bittman, and R.E. Pagano. 2007. Inhibition of caveolar uptake, SV40 infection, and β 1-integrin signaling by a nonnatural glycosphingolipid stereoisomer. *J. Cell Biol.* 176:895–901. doi:10.1083/jcb.200609149
- Stolz, A., N. Haines, A. Pich, K.D. Irvine, C.H. Hokke, A.M. Deelder, R. Gerardy-Schahn, M. Wührer, and H. Bakker. 2008. Distinct contributions of beta 4GalNAcTA and beta 4GalNAcTB to *Drosophila* glycosphingolipid biosynthesis. *Glycoconj. J.* 25:167–175. doi:10.1007/s10719-007-9069-5
- Teppas, U., and E. Knust. 1993. Crumbs and Stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 159:311–326. doi:10.1006/dbio.1993.1243
- Tien, A.C., A. Rajan, and H.J. Bellen. 2009. A Notch updated. *J. Cell Biol.* 184:621–629. doi:10.1083/jcb.200811141
- Toba, G., T. Ohsako, N. Miyata, T. Ohtsuka, K.H. Seong, and T. Aigaki. 1999. The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 151:725–737.
- Wandall, H.H., J.W. Pedersen, C. Park, S.B. Levery, S. Pizette, S.M. Cohen, T. Schwientek, and H. Clausen. 2003. *Drosophila* egghead encodes a beta 1,4-mannosyltransferase predicted to form the immediate precursor

glycosphingolipid substrate for brainiac. *J. Biol. Chem.* 278:1411–1414.
doi:10.1074/jbc.C200619200

- Wandall, H.H., S. Pizette, J.W. Pedersen, H. Eichert, S.B. Levery, U. Mandel, S.M. Cohen, and H. Clausen. 2005. Egghead and brainiac are essential for glycosphingolipid biosynthesis in vivo. *J. Biol. Chem.* 280:4858–4863. doi:10.1074/jbc.C400571200
- Weber, U., C. Eroglu, and M. Mlodzik. 2003. Phospholipid membrane composition affects EGF receptor and Notch signaling through effects on endocytosis during *Drosophila* development. *Dev. Cell.* 5:559–570. doi:10.1016/S1534-5807(03)00273-9
- Xu, A., N. Haines, M. Dlugosz, N.A. Rana, H. Takeuchi, R.S. Haltiwanger, and K.D. Irvine. 2007. In vitro reconstitution of the modulation of *Drosophila* Notch-ligand binding by Fringe. *J. Biol. Chem.* 282:35153–35162. doi:10.1074/jbc.M707040200
- Yoon, S.J., K. Nakayama, T. Hikita, K. Handa, and S.I. Hakomori. 2006. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:18987–18991. doi:10.1073/pnas.0609281103
- Zhang, C., Q. Li, C.H. Lim, X. Qiu, and Y.J. Jiang. 2007. The characterization of zebrafish antimorphic mib alleles reveals that Mib and Mind bomb-2 (Mib2) function redundantly. *Dev. Biol.* 305:14–27. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.034

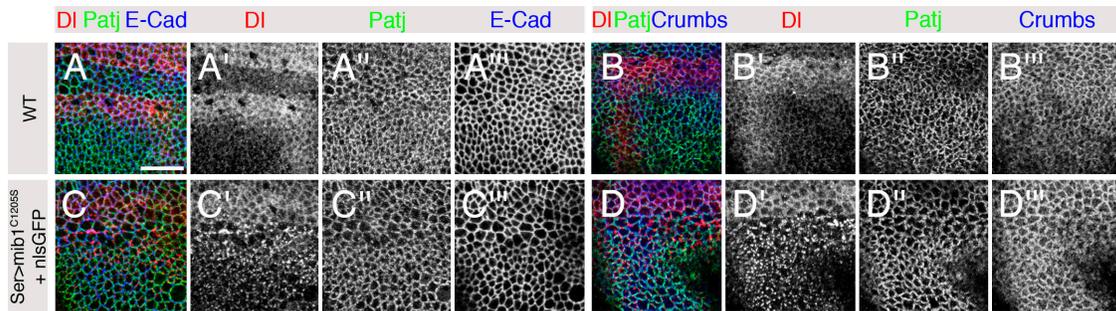
Hamel et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200907116/DC1>

Figure S1. **Mib1^{C12055} did not perturb the distribution of junctional proteins.** The localization of Patj (green), DI (red), E-Cad (blue), and Crumbs (blue) was analyzed in wild-type (A–B''') and *UAS-nlsGFP/UAS-mib1^{C12055}; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+* wing imaginal discs (Ser > mib1^{C12055} + nlsGFP; C–D'''). (A–B''') In wild-type cells, Patj (A'' and B''), E-Cad (A'''), and Crumbs (B''') colocalized apically with DI (A' and B'). (C–D''') Expression of Mib1^{C12055} did not significantly change the distribution of Patj (C'' and D''), E-Cad (C'''), and Crumbs (D''') but specifically perturbed the accumulation of DI (C' and D'). Bar, 10 μ m.

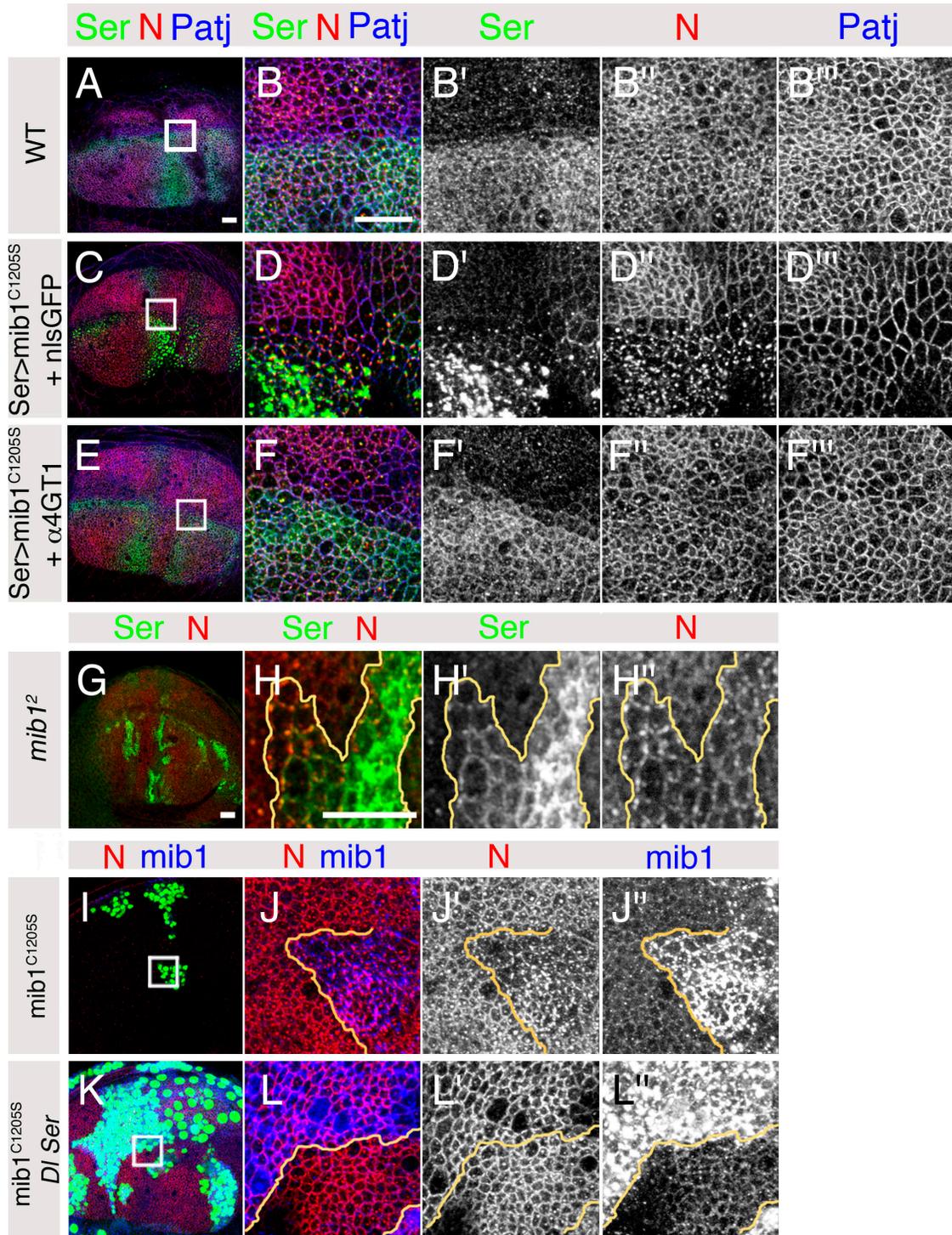


Figure S2. **The Mib1-dependent defects in Notch localization required DI and/or Ser.** (A–H'') Ser (green), Notch (N; red), Patj (blue), and Mib1 (blue) distribution were analyzed in wing imaginal discs. The following genotypes were studied: wild-type (WT; A–B'''), *UAS-nlsGFP/UAS-mib1^{C1205S}*; *Ser-Gal4 tub-Gal80^Δ/+* (*Ser > mib1^{C1205S} + nlsGFP*; C–D'''), *UAS-mib1^{C1205S}/+*; *Ser-Gal4 tub-Gal80^Δ/GS2078* (*Ser > mib1^{C1205S} + α4GT1*; E–F'''), *mib1^{Δ2}* mutant cells (H–H'', clone boundaries outlined in yellow), and Mib1^{C1205S}-expressing cells (wild-type and *Df^{ev10} Ser^{Rx82}* clones marked by GFP were induced in *hs-flp tub-Gal4 UAS-GFP/UAS-mib1^{C1205S}; FRT82B/tub-Gal80 FRT82B* larvae). High magnification views of areas boxed in A, C, and E are shown in B–B''', D–D''', and F–F''', respectively. (A–B''') In wild-type cells, Ser colocalized with Notch and Patj at the apical cortex. (C–D''') Expression of Mib1^{C1205S} led to the accumulation of Ser and Notch into large apical dots. In contrast, Patj distribution was unaffected. (E–F''') Expression of α4GT1 restored the proper distribution of Ser and Notch in Mib1^{C1205S}-expressing cells. Patj remained properly localized at the apical cortex. (G–H'') Ser accumulated at the apical cortex of *mib1^{Δ2}* mutant cells (H'). (H'') Small Notch dots were also detected. (I–J'') Expression of Mib1^{C1205S} in clones marked by GFP (green) similarly resulted in the aggregation of Notch into apical dots (J'). (K–L'') In the absence of both DI and Ser, Mib1^{C1205S} had no effect on Notch localization. *DI Ser* mutant cells overexpressing Mib1^{C1205S} (GFP in green) did not accumulate Notch in apical dots. In contrast, Mib1^{C1205S} (blue; Mib1^{C1205S} was detected using anti-Mib1) accumulated into dots in a ligand-independent manner. The defective localization of Notch in *mib1^{C1205S}*-expressing cells therefore appeared to be an indirect consequence of the defective accumulation of Ser and DI. High magnification views of areas boxed in I and K are shown in J–J'' and L–L'', respectively. Bars, 10 μm.

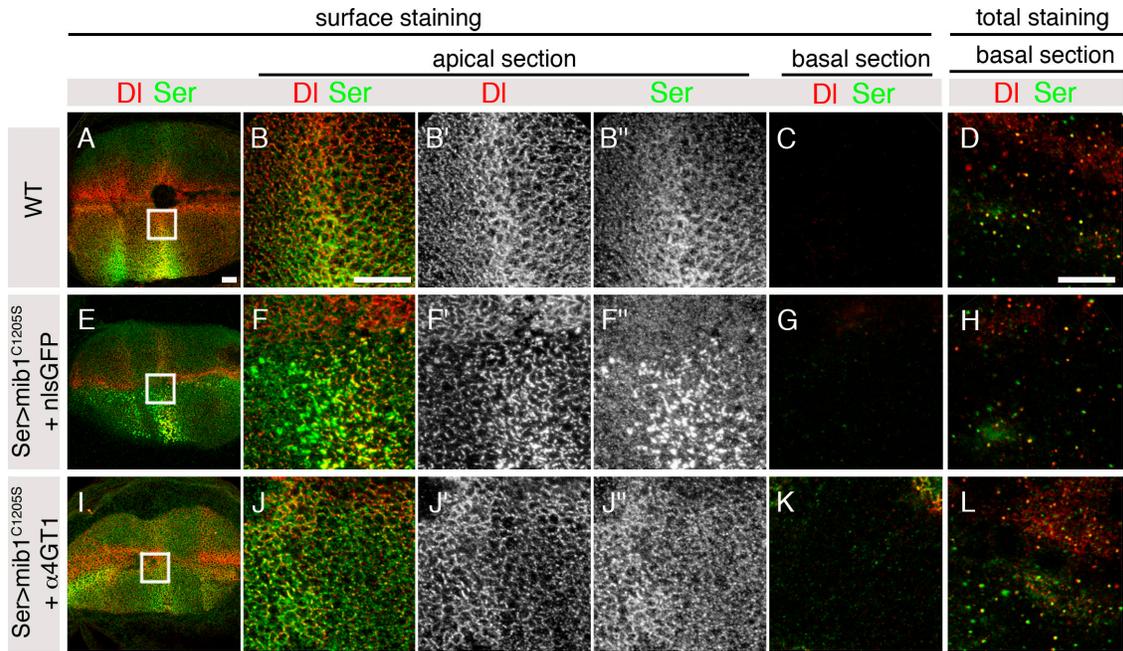


Figure S3. **DI and Ser localized at the surface of Mib1^{C12055}-expressing cells.** (A–L) Cell surface staining analysis of DI (red) and Ser (green) in wild-type (WT; A–D), *UAS-nlsGFP/UAS-mib1^{C12055}; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/+* (*Ser > mib1^{C12055} + nlsGFP*; E–H), and *UAS-mib1^{C12055}/+; Ser-Gal4 tub-Gal80^{ts}/GS2078* (*Ser > mib1^{C12055} + α4GT1*; I–L) wing imaginal discs. High magnification views of the areas boxed in A, E, and I are shown in B–D, F–H, and J–L, respectively. (C, G, and K) Corresponding basal sections are shown. (D, H, and L) The distribution of total DI and Ser in permeabilized cells are shown. Basal sections (the corresponding apical sections are shown in Fig. 3, B, D, and F) are shown. (A–D) DI and Ser were detected at the apical surface of wing imaginal cells. (C) DI and Ser were not detected in basal sections in these staining conditions, indicating that antibodies bound proteins present at the cell surface only. (E–H) Coexpression of α4GT1 and Mib1^{C12055} did not significantly change the cell surface distribution of DI and Ser relative to wild-type controls. Bars, 10 μm.

Annexes du chapitre 2

Les résultats présentés dans ces annexes correspondent à des résultats négatifs qui complètent certaines parties de l'article. Je présente aussi des résultats préliminaires concernant la détection de Delta dans des fractions membranaires résistantes au Brij qui devaient me permettre de tester le rôle des ubiquitine ligases dans la localisation de Delta dans ces fractions membranaires résistantes au détergent *in vivo*. Et enfin, je présente des résultats concernant l'analyse du rôle d'*egh* et de *brn* dans la signalisation Notch ainsi que des résultats préliminaires concernant l'analyse du phénotype de polarité apical des embryons *brn* qui ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle des GSLs dans le maintien de la polarité apicale.

1 Résultats négatifs et/ou complémentaires à ceux présentés dans l'article

1.1 Analyse du mutant $\alpha 4GT1$ et du double mutant $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$ en perte de fonction zygotique et maternelle

Pour tester le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch, différents allèles d' $\alpha 4GT1$ et $\alpha 4GT2$ ont été générés (et sont présentés dans le papier). Si 10% des embryons *Df(2L)7819* meurent avec un phénotype de désorganisation des tissus embryonnaires (non montré), ce phénotype est attribué à l'un des 4 autres gènes délétés par la déficience et pas à une perte d'activité d' $\alpha 4GT1$. En effet, les transhétérozygotes *Df(2L)7819/\alpha 4GT1¹* ne présentent pas de létalité embryonnaire en perte de fonction maternelle et zygotique (Figure 1, lignes 1, 2 et 3 du tableau). Le double mutant $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$ ne présente pas non plus de létalité embryonnaire (Figure 1, lignes 4 du tableau). Aucune létalité larvaire, pupale ou adulte n'a ensuite été observée chez

le mutant $\alpha 4GT1$. Aucun phénotype au niveau de la marge de l'aile, de la segmentation des pattes ou de la morphologie du reste du corps n'a été remarqué. Un phénotype de double soie a été remarqué avec une faible pénétrance (1 position sur 4 mouches, sur un total de 24 mouches analysées en détail) chez les mutants $Df(2L)7819/ \alpha 4GT1^1$ (Figure 2, A-B). Ce phénotype peut être attribué à un problème de lignage au moment de la division asymétrique qui va dans le sens d'un défaut d'activation Notch ou à une fourche de la soie sensorielle. La faible pénétrance du phénotype n'a pas permis de compter et identifier les cellules présentes.

Génotype des femelles	Génotype des mâles	Embryons alignés	larve L1	Embryons GFP+ morts	Embryons GFP- morts	Embryons non fertilisés
$Df(2L)7819/ \alpha 4GT1^2$	$\alpha 4GT1^1/ CyOGFP$	180	150	2	3	25 (14%)
$\alpha 4GT1^2/ \alpha 4GT1^1$	$Df(2L)7819/ CyOGFP$	200	160	1	1	38 (19%)
$Df(2L)7819/ \alpha 4GT1^1$	$\alpha 4GT1^2/ CyOGFP$	160	150	2	1	7 (4%)
$Df(2L)7819 ; \alpha 4GT2^1$	$\alpha 4GT1^1/ CyOGFP ; \alpha 4GT2^1$	240	186	1	1	52 (22%)
WT	WT	100	85	0	0	15 (15%)

Figure 1: Analyse de la viabilité de la perte de fonction maternel d' $\alpha 4GT1$ et du double mutant $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$

Analyse de la viabilité embryonnaire de la perte de fonction maternelle d' $\alpha 4GT1$ et $\alpha 4GT2$. Différentes combinaisons alléliques de femelles mutantes $\alpha 4GT1$ et $\alpha 4GT1; \alpha 4GT2$ sont croisées avec différents allèles d' $\alpha 4GT1$ et $\alpha 4GT1; \alpha 4GT2$, les croisements correspondent aux lignes du tableau. La viabilité de la descendance est analysée en alignant entre 100 et 240 embryons sur une boîte de pétrie. Après plus de 24h, le nombre de larve est compté, ainsi que le nombre d'embryons morts. Parmi les embryons morts on distingue les embryons non fertilisé par leur couleur et leur transparence. Le taux d'œufs non fertilisés varie de 4 à 22%, il est de 15% chez le contrôle sauvage. Aucune létalité embryonnaire n'est observée.

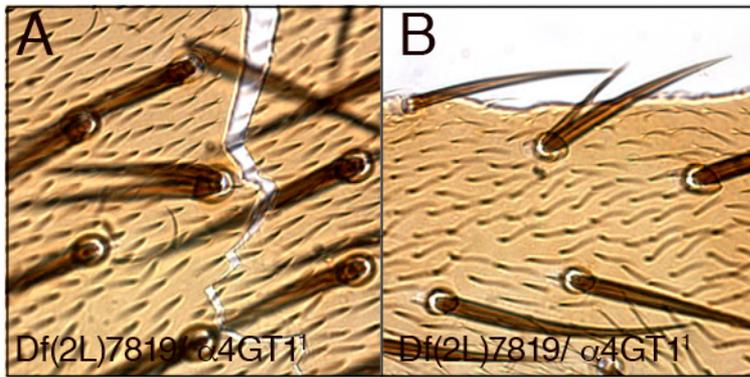


Figure 2: La perte de fonction zygotique d' $\alpha 4GT1$ présente un phénotype de soie sensoriel avec une faible pénétrance.

4 mouches sur 24 analysée présentent un phénotype de double soie qui correspond soit à un défaut de lignage au moment de la division asymétrique soit à une fourche. Deux exemples, A et B, sont documentés.

1.2 Utilisation du test de compétition pour l'adoption du destin SOP pour tester le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch

Toujours pour tester le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch, j'ai utilisé le test de compétition de destin cellulaire au moment de l'inhibition latérale. Ce test permet de mettre en évidence des modulations fines de la signalisation Notch entre des cellules de génotypes différents (Heitzler and Simpson 1991).

1.2.1 Le principe

Chaque précurseur d'organe sensoriel (SOP) est individualisé dans un groupe de cellules proneurales toutes équipotentes dans leur capacité à devenir soit une cellule épidermale soit une SOP. La sélection de la SOP dans ce cluster proneural est le résultat d'une compétition. Toutes les cellules du cluster proneural expriment initialement des niveaux similaires de Notch et de Delta, et toutes les cellules inhibent mutuellement leur spécification en SOP en activant la voie Notch chez leur voisines et en réduisant alors par un rétrocontrôle négatif leur capacité à exprimer Delta. Cette de compétition au sein du cluster proneural pour l'adoption du destin

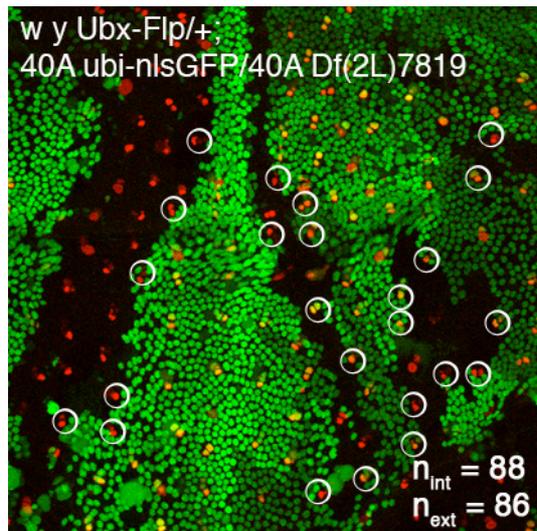
SOP a été mis en évidence par des analyses clonales qui montrent que le niveau d'activité Notch dans une cellule influence le destin de ses voisines (Heitzler and Simpson 1991). Ainsi, des cellules avec un niveau deux fois supérieur d'activité Delta vont inhiber leurs voisines, plutôt que d'être inhibées par elles, et gagnent la compétition pour devenir la SOP. Réciproquement, des cellules avec un niveau inférieur d'activité Notch vont être plus difficile à inhiber que leurs voisines, et gagnent la compétition. Ce système permet de mettre en évidence des modulations fines de la signalisation Notch.

1.2.2 Les résultats

Pour tester le rôle d' $\alpha 4GT1$ dans cette compétition entre les cellules pour activer Notch chez leurs voisines et devenir SOP, j'ai comparé la capacité relative de cellules sauvage et de cellules mutante pour $\alpha 4GT1$ (d'un même cluster proneural) à entrer en compétition pour adopter le destin SOP. J'ai donc examiné la position des SOP à la frontière d'un clone *Df(2L)7819* (Figure 3), sans détecter aucun biais. Sur 174 positions analysées (ce qui correspond à 16 grands clones) la moitié est dépourvue d'activité $\alpha 4GT1$ (88/174 SOP du côté intérieur du clone) et l'autre moitié est sauvage (86/174 SOP du côté extérieur du clone) (Figure 3). L'absence d' $\alpha 4GT1$ n'influence donc pas le choix du destin cellulaire le long de la frontière des clones. $\alpha 4GT2$ n'étant pas inactivé on ne peut pas exclure une redondance avec $\alpha 4GT1$ qui masquerait sa fonction dans l'inhibition latérale.

Le même type d'expérience mais avec des clones qui surexpriment $\alpha 4GT1$ a été fait. Dans ce cas sur un total de 36 positions à la frontière des clones (11 clones), 9 surexpriment $\alpha 4GT1$ et 27 sont sauvages (3 fois plus) (Figure 3). Ce biais peut être interprété de multiples façons. La surexpression $\alpha 4GT1$ pourraient par exemple activer le récepteur Notch à l'intérieur du clone et donner l'avantage aux cellules sauvages. Il est aussi possible que ce biais soit induit par une différence de viabilité entre les cellules sauvages et les cellules surexprimant $\alpha 4GT1$.

A



B

Génotype du clone	n int du clone	n ext du clone (WT)
mutant $\alpha 4GT1$	88	86
<i>ole</i> $\alpha 4GT1$	9	27
<i>egh</i> ^{62d18}	24	17

Figure 3 : Analyse de l'influence de la modulation des GSLs dans la compétition pour le destin SOP au cours de l'inhibition latérale

A : L'absence d'activité $\alpha 4GT1$ n'influence pas la compétition pour le destin SOP au cours de l'inhibition latérale.

La compétition pour l'adoption du destin SOP a été étudiée le long de la frontière de clones mutant pour $\alpha 4GT1$. Les SOP sont marquées par Sens (rouge), celles qui touchent la frontière du clone sont encadrées. Les clones Df(2L)7819 sont marqués par l'absence de GFP. Sur 174 positions à la frontière de ces clones, 88 sont des SOP à l'intérieur du clone, donc sans activité $\alpha 4GT1$, et 86 sont à l'extérieur du clone et donc sauvage. Il n'y a donc pas de biais significatif.

B : Tableau récapitulatif de l'analyse de la position des SOP à la frontière de clones mutant pour $\alpha 4GT1$, surexprimant $\alpha 4GT1$ et mutant pour *egh*. Si la perte de fonction $\alpha 4GT1$ ne biaise pas la compétition (88/86), ne n'est pas le cas de la surexpression d' $\alpha 4GT1$ (9/27), ni de la perte de fonction d'*egh* (24/17).

1.3 La localisation subcellulaire de Df et Ser n'est pas affectée par la perte d'activité $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$, ni par la surexpression d' $\alpha 4GT1$

Afin de tester l'effet de la modulation des GSLs sur la localisation subcellulaire des ligands des cellules du disque d'aile, la localisation apico-basale des ligands dans des cellules dépourvues d'activité $\alpha 4GT$ $\alpha 4GT2$, et des cellules surexprimant $\alpha 4GT1$ (Figure 4), a été attentivement analysée et comparée aux cellules sauvages. Aucune modification de la localisation subcellulaire des ligands Delta et Serrate n'a été observée dans les cellules mutantes pour $\alpha 4GT1$ (clones Df(2L)7819, et mutant Df(2L)7819/ $\alpha 4GT1^1$, donnée non montrée), ni dans le double mutant $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$ (Figure 4). L'effet de la surexpression d' $\alpha 4GT1$ en clone (non montré) et dirigée par Ser-GAL4 (Figure 4) a aussi été analysé sans qu'aucun phénotype ne soit détecté au niveau de la localisation subcellulaire des ligands Delta et Serrate, du récepteur Notch, ou de Mib1 endogène (non montré).

Aucune modification de la localisation subcellulaire des ligands Delta et Serrate n'a non plus été observée dans les mutantes *egh* ou *brn* (voir la partie 3.1 de l'annexe, Figure 8).

À ce niveau de résolution et dans les cellules imaginales de disques d'aile, aucun phénotype clair concernant la localisation subcellulaire des ligands n'a donc été détecté ni dans le mutant $\alpha 4GT1$ ou le double mutant $\alpha 4GT1$ $\alpha 4GT2$, ni dans la surexpression d' $\alpha 4GT1$, ni dans les mutants *egh* et *brn*.

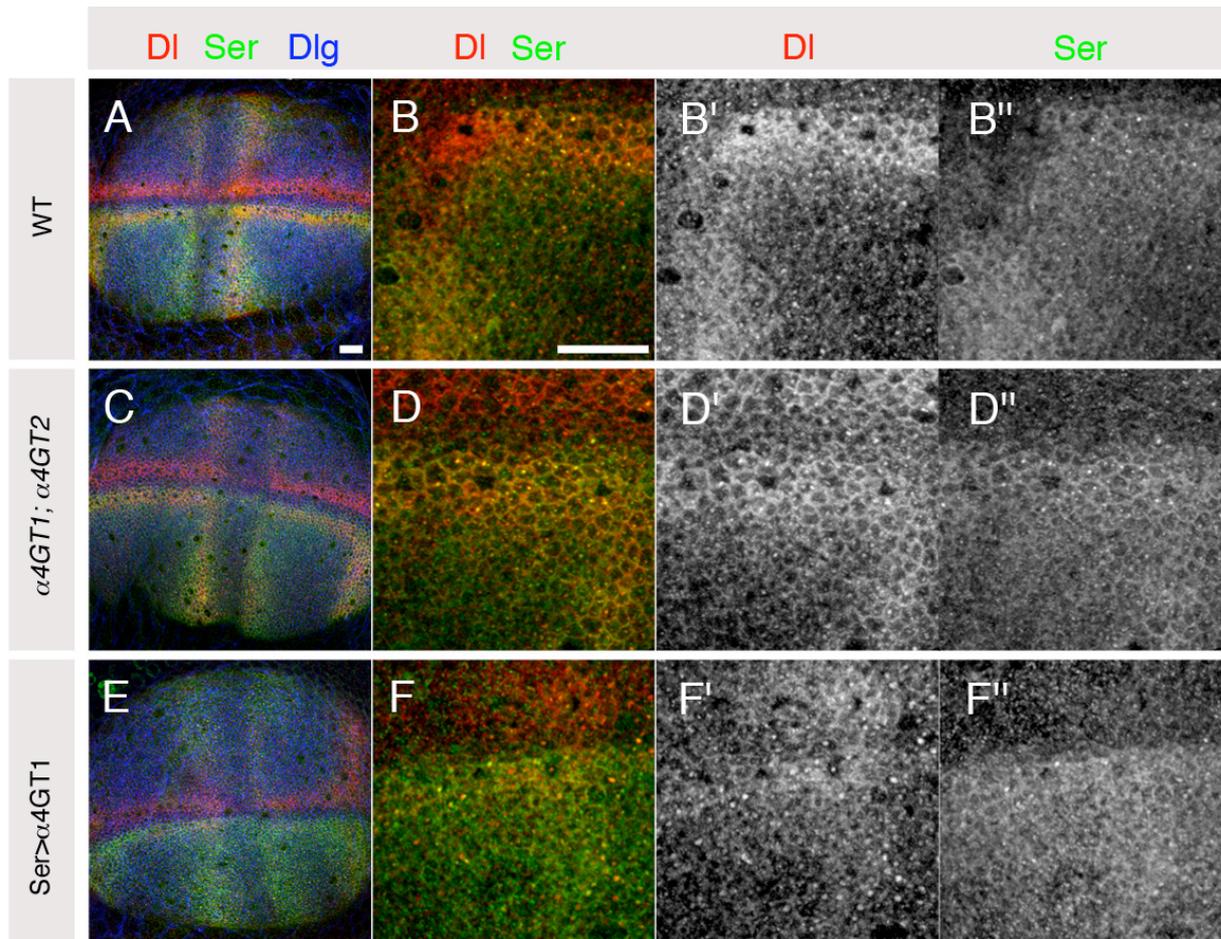


Figure 4: La localisation de Delta et Serrate n'est pas affectée par la perte ou le gain d'activité $\alpha 4GT1$.

La distribution de DI (en rouge) et Ser (en vert ; Dlg en bleu) a été examinée dans des disques imaginaux d'aile des génotypes suivants :

A-B' : disque imaginal d'aile sauvage

C-D'' : disque imaginal d'aile double mutant $\alpha 4GT1^1/Df(2L)7819 ; \alpha 4GT2^1$

E-F'' : disque imaginal d'aile surexprimant $\alpha 4GT1$ dans le domaine de Ser : Ser-GAL4 / GS2078

Aucun changement significatif dans la distribution de DI et Ser n'a été observé.

1.4 L'endocytose de DI dans des endosomes Rab5 est bloquée par le dominant négatif Mib1^{C1205S}, et ce blocage est levé par l'expression d' α 4GT1

Si la surexpression d' α 4GT1 n'a pas d'effet en contexte sauvage sur l'internalisation de DI (Figure 6 C-D' du papier JCB), j'ai pu montrer par des tests d'endocytose que la surexpression d' α 4GT1 restaurait l'endocytose de DI dans différents contextes sensibilisés par une réduction des activités des ubiquitine ligases Mib1 et Neur (Figure 5 et 6 du papier JCB). En plus de ces tests d'endocytose, j'ai aussi examiné à steady-state la localisation de DI dans les compartiments positifs pour Rab5 (Figure 5). Ces endosomes Rab5 sont détectés grâce à un marqueur YFP-Rab5, exprimé à faible niveau grâce à un promoteur constitutif α -tubulin, (Marois et al., 2006, Development, 133, 307-17). Cette analyse indique que l'endocytose de DI dans des endosomes Rab5 est inhibée par le dominant négatif Mib1^{C1205S}, et que cette inhibition est sauvée par l'expression d' α 4GT1. Ce résultat est complémentaire des tests d'endocytose confirme qu' α 4GT1 restaure l'endocytose des ligands de Notch dans des contextes où l'activité ubiquitine ligase est réduite.

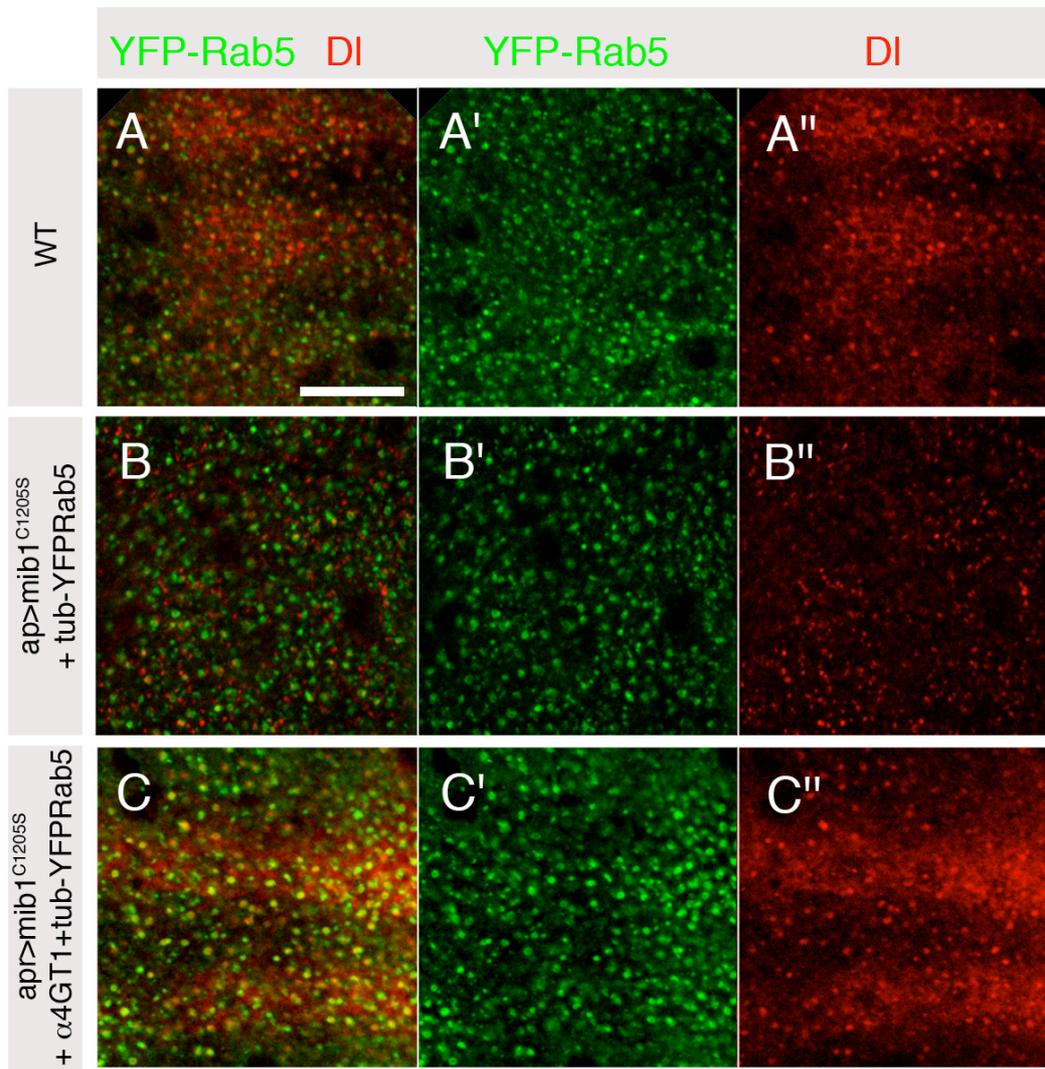


Figure 5 : L'endocytose de DI dans des endosomes Rab5 est inhibée par le dominant négatif Mib1^{C1205S} et cette inhibition est sauvée par l'expression d' $\alpha 4GT1$

A-A'': disque imaginal d'aile sauvage. La grande majorité des vésicules positives pour DI (en rouge) , et localisées dans la région subapicale des cellules, sont aussi positives pour YFP-Rab5.

B-B'': disque imaginal d'aile ap-GAL4 / UAS-mib1^{C1205S}, pTub-YFP-Rab5 / + (noté ap> mib1^{C1205S} + pTub-YFP-Rab5). La grande majorité des vésicules positives pour DI ne colocalisent pas avec les vésicules positives pour YFP-Rab5.

C-C'': disque imaginal d'aile ap-GAL4 / UAS-mib1^{C1205S}, pTub-YFP-Rab5 / UAS- $\alpha 4GT1$ (noté ap> mib1^{C1205S} + $\alpha 4GT1$ + pTub-YFP-Rab5). La grande majorité des vésicules positives pour DI (en rouge) , et localisées dans la région subapicale des cellules, sont aussi positives pour YFP-Rab5.

2 Delta est détecté dans des domaines membranaires résistants à la solubilisation par le Brij98, dans l'embryon

L'interaction *in vitro* entre le motif GBM des ligands et les GSLs suggère une interaction directe des ligands avec les GSLs de la membrane. Selon la nature de leur environnement lipidique, les protéines membranaires résistent plus ou moins à la solubilisation dans certaines conditions d'utilisation de détergent. Les protéines résistantes à la solubilisation peuvent être isolées car elles flottent avec leur environnement lipidique sur un gradient de densité. Dans des systèmes de membranes modèles, il y a une corrélation entre les domaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides, et la résistance aux détergents (voir la partie 3.3.1 de l'introduction). Si on fait l'hypothèse que les réarrangements lipidiques lors de la solubilisation sont négligeables, la résistance d'une protéine membranaire au détergent reflète potentiellement un environnement lipidique riche en cholestérol et en sphingolipides *in vivo*, et deux protéines membranaires avec des profils de solubilisation différents sont potentiellement localisées dans deux domaines lipidiques différents.

Dans les cellules OP9 de mammifères exprimant Dll1 de façon stable, Dll1 est isolé dans des domaines membranaires résistants à la solubilisation par 1% de Brij98 sur gradient de sucrose. En revanche, sa version dans laquelle les lysines, acceptrices d'ubiquitine, sont mutées, qui est bien endocytée mais ne recycle pas et n'interagit moins efficacement avec Notch 1, est majoritairement solubilisé dans les mêmes conditions (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008). Ce résultat suggère un rôle de l'ubiquitination, non pas dans l'endocytose de Dll1 mais dans son recyclage dans un environnement lipidique résistant au détergent.

J'ai donc voulu tester la localisation de DI dans des DRM par cette méthode dans des embryons de drosophile, pour ensuite potentiellement tester le rôle de l'ubiquitine ligase Neur dans la nature de l'environnement lipidique de DI.

2.1 Le choix de l'embryon

Pour pouvoir détecter les ligands par western blot après fractionnement des membranes cellulaires sur gradient de densité, il me fallait de relativement grande quantité de tissu dans lequel l'un au moins des ligands, est détectable par western blot. Il est facile d'obtenir de grande quantité d'embryons en mettant en place des pondoirs, et le niveau de DI est maximal entre 4 et 6h après la ponte ce qui correspond aux stades 9 à 11. C'est aussi un contexte où DI a une activité signalisatrice dans la spécification des neuroblastes. Cette activité signalisatrice dépend de *neur*, et une absence de *neur* entraîne un phénotype neurogénique avec un excès de différenciation neuronale par rapport aux cellules de l'ectoderme.

2.2 Le protocole

Un protocole ayant été mis au point pour les cellules OP9 avec 1% de Brij98, j'ai donc commencé par tester ces conditions de solubilisation (voir Matériels et Méthodes). Des embryons sont donc récoltés, broyés dans la solution de Brij98 à 1% puis déposés dans un gradient de sucrose et centrifugés. Les différentes fractions membranaires sont ensuite analysées par western blot.

2.3 Les résultats

Pour montrer que des protéines transmembranaires avec des environnements lipidiques différents peuvent être isolées par cette méthode, il faut identifier deux protéines transmembranaires contrôles, l'une résistante aux détergents et détectée dans les fractions légères, et l'autre, solubilisée, et retrouvée dans les fractions lourdes. La protéine transmembranaire syntaxine 1A (*synt1A*) a servi de contrôle positif pour les DRM (Zhai, Chaturvedi et al. 2004). DI et *synt1A* sont majoritairement

retrouvés dans les fractions légères (2-3) qui correspondent aux DRM (Figure 6). En revanche, Notch est retrouvé à la fois dans les fractions membranaires légères (2-3, DRM) et dans les fractions lourdes solubilisées (8-9-10) suggérant que Notch a deux environnements lipidiques différents. On peut donc conclure qu'une partie au moins de la protéine Notch dans les membranes de cellules d'embryons a un environnement lipidique différent de celui de Delta.

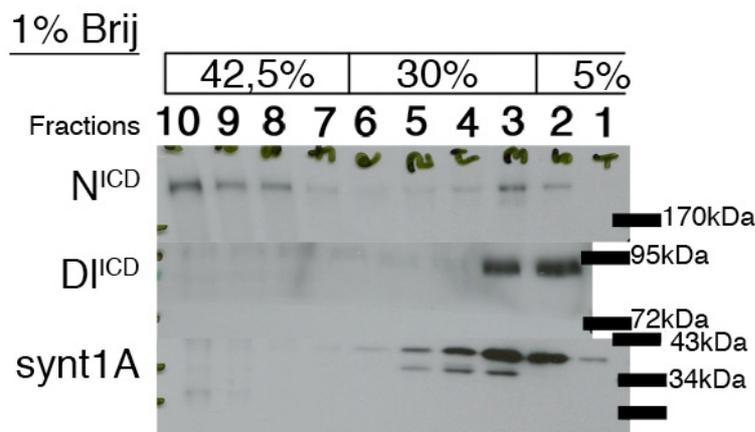


Figure 6 : DI et synt1A sont détectés dans les fractions légères 2-3, alors que Notch est à la fois dans les fractions légères 2-3 et les fractions lourdes 8-9-10

DI (89kDa) et la syntaxine 1A (35kDa) sont majoritairement retrouvés dans les fractions légères (2-3) qui flottent sur le gradient de sucrose à l'interface 30%-5% de sucrose. En revanche, Notch (290kDa, taille de la protéine entière non clivée) est retrouvé à la fois dans les fractions légères (2-3) et dans les fractions lourdes (8-9-10, solubilisées), ce qui signifie qu'il est en partie solubilisé.

Reproductibilité : L'expérience a été répétée indépendamment 5 fois. DI et synt1A sont toujours retrouvés dans les fractions légères à l'interface 30%-5% de sucrose. Sur ces 5 expériences, Notch n'a été révélé que 3 fois, et il est retrouvé dans les fractions légères et dans les fractions lourdes dans des proportions équivalentes.

2.4 Remarques concernant les contrôles de cette expérience

J'ai cherché à identifier une protéine transmembranaires totalement solubilisé et absente des fractions DRM sans succès. Cadherin, Echinoid et Neurotactin sont retrouvées majoritairement dans les fractions DRM 2-3. Il est donc difficile d'évaluer la portion de membranes résistante à la solubilisation par le Brij98 et l'efficacité de cette solubilisation. L'augmentation de la concentration de Brij98 jusqu'à 5% ne modifie pas les profils de solubilisation de synt1A, DI et Notch.

Cette analyse est faite sur la totalité des membranes cellulaires, et je ne sais pas à quel compartiment membranaire : membrane plasmique, golgi, réticulum endoplasmique ou endosomes, appartiennent ces deux pools (solubilisé et résistant) de Notch. Il serait possible de séparer la membrane plasmique des autres membranes cellulaires par centrifugation sur gradient de densité (Rietveld, Neutz et al. 1999) et de faire ensuite seulement la solubilisation avec la solution de Brij98 sur un échantillon enrichi en membrane plasmique.

3 Analyse de la fonction d'*egghead* et *brainac* dans la signalisation Notch et dans le maintien de la polarité apico-basale chez l'embryon

3.1 Analyse du rôle d'*egghead* et *brainac* dans la signalisation Notch

Les mutants zygotiques *egh*^{62d18} et *brn*^{1.6P6} sont létaux au stade pupal (Goode, Melnick et al. 1996) et certaines pupes se développent suffisamment tard pour permettre l'analyse du notum et des ailes. Ces rescapés (*egh*^{62d18}/Y et *brn*^{1.6P6}/Y) ne présentent aucun phénotype évident d'inhibition latérale, mais quelques ailes *egh*^{62d18} présentent des encoches (Figure 7, D-G). L'allèle *brn*^{fs107} est viable en perte de fonction zygotique et ne présente pas de phénotype apparent.

La surexpression d'*egh* et *brn* ne sauve pas le phénotype induit par *Mib1*^{C1295S} dans l'aile (Figure 7, A-C), ce qui est cohérent avec le fait qu' α 4GT1 est l'étape limitante dans la voie de biosynthèse des GSLs.

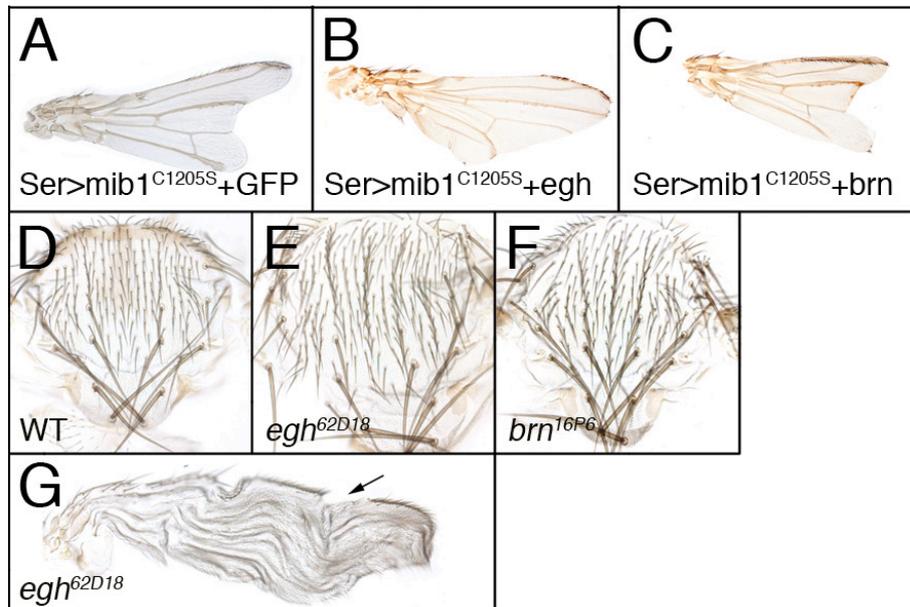


Figure 7 : La surexpression d'*egh* et *brn* ne sauve pas le phénotype induit par *Mib1*^{C1205S} dans l'aile et les mutants ne présentent pas de phénotype évident d'inhibition latérale

A-C : Ni la surexpression d'*egh* (B, *UAS-mib1*^{C1205S/+} ; *Ser-Gal4 tub-Gal80*^{ts/+} ; *UAS-egh/+*), ni celle de *brn* (C, *UAS-mib1*^{C1205S/+} ; *Ser-Gal4 tub-Gal80*^{ts/+} ; *UAS-brn/+*) ne sauvent le phénotype induit par le dominant-négatif *Mib1*^{C1205S} dans l'aile (A, *UAS-mib1*^{C1205S/+} ; *Ser-Gal4 tub-Gal80*^{ts/+}).

D-G : Les mutants *egh*^{62d18} et *brn*^{1.6P6} sont létaux au stade pupal. Les notum des rescapés qui survivent suffisamment longtemps pour être disséqués ne présentent pas de phénotype d'inhibition latérale (E et F comparé à D). Une aile *egh*^{62d18} présente une encoche au niveau de la marge (indiquée par une flèche) sur une dizaine de pupes disséquées (G).

La localisation subcellulaire des ligands de Notch a été analysée dans des disques d'aile de mâles *egh*^{62d18/Y} et *brn*^{1.6P6/Y} et comparé à des disques sauvages sans révéler de différences (non montré). Cette comparaison a aussi été faite en clones pour pouvoir plus facilement comparer les cellules sauvages aux cellules mutantes adjacentes sans non plus révéler de différences (Figure 8).

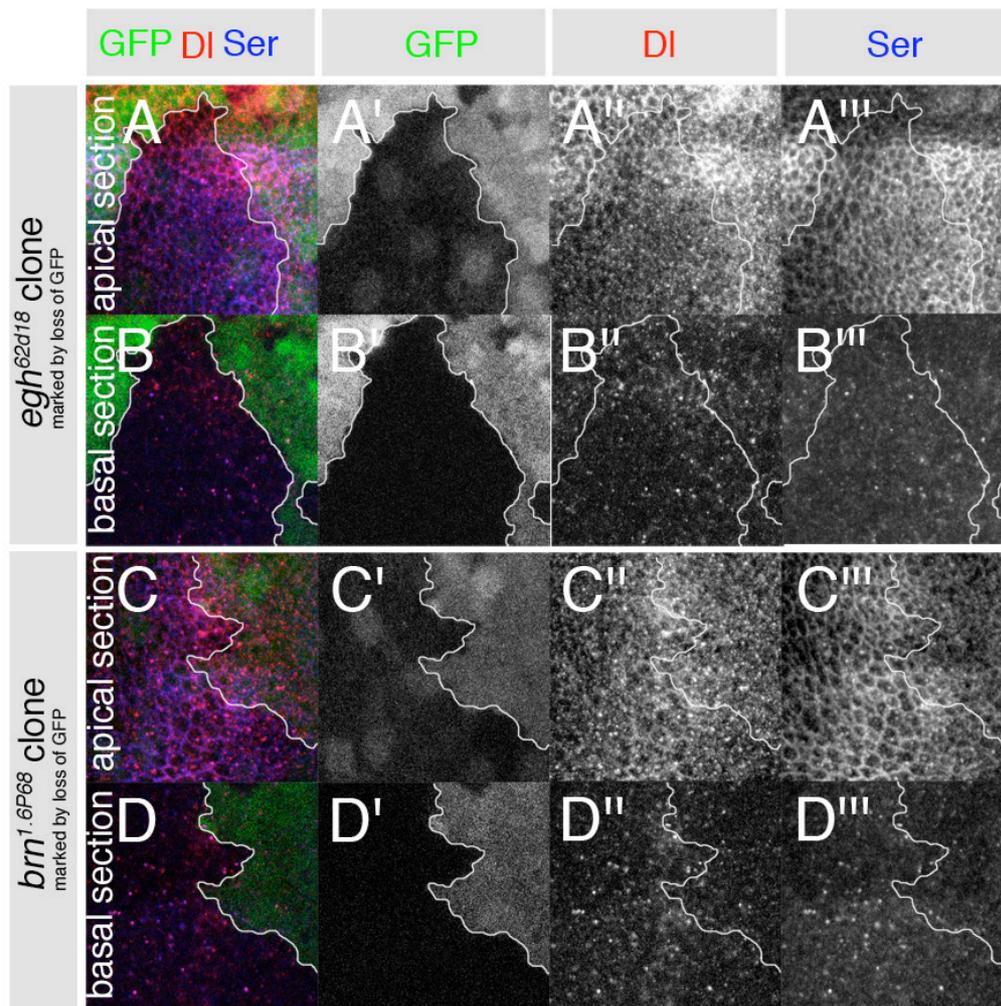


Figure 8 : La localisation subcellulaire des ligands est inchangée dans les cellules *egh*, et les cellules *brn* par rapport aux cellules sauvages

A-B''' : Analyse de la localisation subcellulaire des ligands Delta (rouge) et Serrate (bleu) dans des clones *egh^{62d18}* marqué par l'absence de GFP dans le disque imaginal d'aile (*egh^{62d18} FRT18E/ubi-GFP FRT18E ; Ubx-Flp*). Les panneaux A-A''' correspondent à une section apicale d'un clone qui touche la marge du disque d'aile. Le niveau apical des ligands ne semble pas modifié par l'absence de *egh*. Les panneaux B-B''' correspondent à une section plus basale de la même région, aucune différence dans la répartition et l'intensité des vésicules Delta et Serrate n'est détectée.

C-D''' : Analyse de la localisation subcellulaire des ligands Delta (rouge) et Serrate (bleu) dans des clones *brn^{1.6P6}* marqué par l'absence de GFP dans le disque imaginal d'aile (*brn^{1.6P6} FRT18E/ubi-GFP FRT18E ; Ubx-Flp*). Les panneaux A-A''' correspondent à une section apicale d'un clone situé sur une veine présomptive du disque d'aile. Le niveau apical des ligands ne semble pas modifié par l'absence de *brn*. Les panneaux B-B''' correspondent à une section plus basale de la même région, aucune différence dans la répartition et l'intensité des vésicules Delta et Serrate n'est détectée.

Pour tester le rôle potentiel d'*egh* dans la compétition pour le destin SOP et dans la modulation de la signalisation Notch, la position des SOP à la frontière de clones mutant pour *egh* a été analysée. Sur un total de 41 positions à la frontière des clones

(9 clones), 24 sont mutantes pour *egh* et 17 sont sauvages (Figure 3 dans la partie 1.2 de cette annexe). Ce biais va dans le sens d'un défaut de signalisation Notch dans les cellules mutantes pour *egh*. Pour savoir si ce biais est significatif, la position des SOP à la frontière de clones sauvages doit être analysée et comparée à la position des SOP à la frontière de clones de différents allèles d'*egh*, ainsi que des allèles de *brn*.

3.2 Analyse du phénotype embryonnaire de *brn*^{fs107}

3.2.1 Le phénotype de cuticule atrophiée de la perte de fonction maternelle de *brainac* n'est pas corrélé à un phénotype neurogénique...

egh et *brn* ont à l'origine été identifiés à cause de leur phénotype de cuticule atrophiée en perte de fonction maternelle (Goode, Melnick et al. 1996). Ce phénotype est superficiellement similaire au phénotype de cuticule induit par une différenciation excessive de neurones par rapport aux cellules de l'ectoderme responsables de la sécrétion de la cuticule. Afin de tester la corrélation entre le phénotype de cuticule atrophiée et un potentiel excès de différenciation neurale dû à un défaut de signalisation Notch, le phénotype de *brn*^{fs107} qui a l'avantage d'être homozygote viable (ce qui dispense de faire des clones germinaux) a été analysé. Les femelles homozygotes *brn*^{fs107} croisées avec des mâles *brn*^{fs107}/Y pondent des embryons qui meurent avec un phénotype de cuticule atrophiée comparable au phénotype de *brn*^{1.6P6} publié, et à celui du mutant *neur* (Figure 9, A,C,E). La révélation du système nerveux périphérique de ces embryons montre que les neurones périphériques sont légèrement déorganisés, avec des projections axonales qui peuvent passer d'un segment à l'autre, mais sans être plus nombreux que dans l'embryon sauvage. L'embryon *neur* présente en revanche clairement un excès de différenciation neurale, avec des amas de neurones. En conclusion, le phénotype de cuticule atrophiée de la perte de fonction maternelle de *brn* n'est pas corrélé à une différenciation excessive de neurones et donc à un défaut de signalisation Notch. Le phénotype de la perte de fonction maternelle d'*egh* dans les embryons n'a pas été analysés.

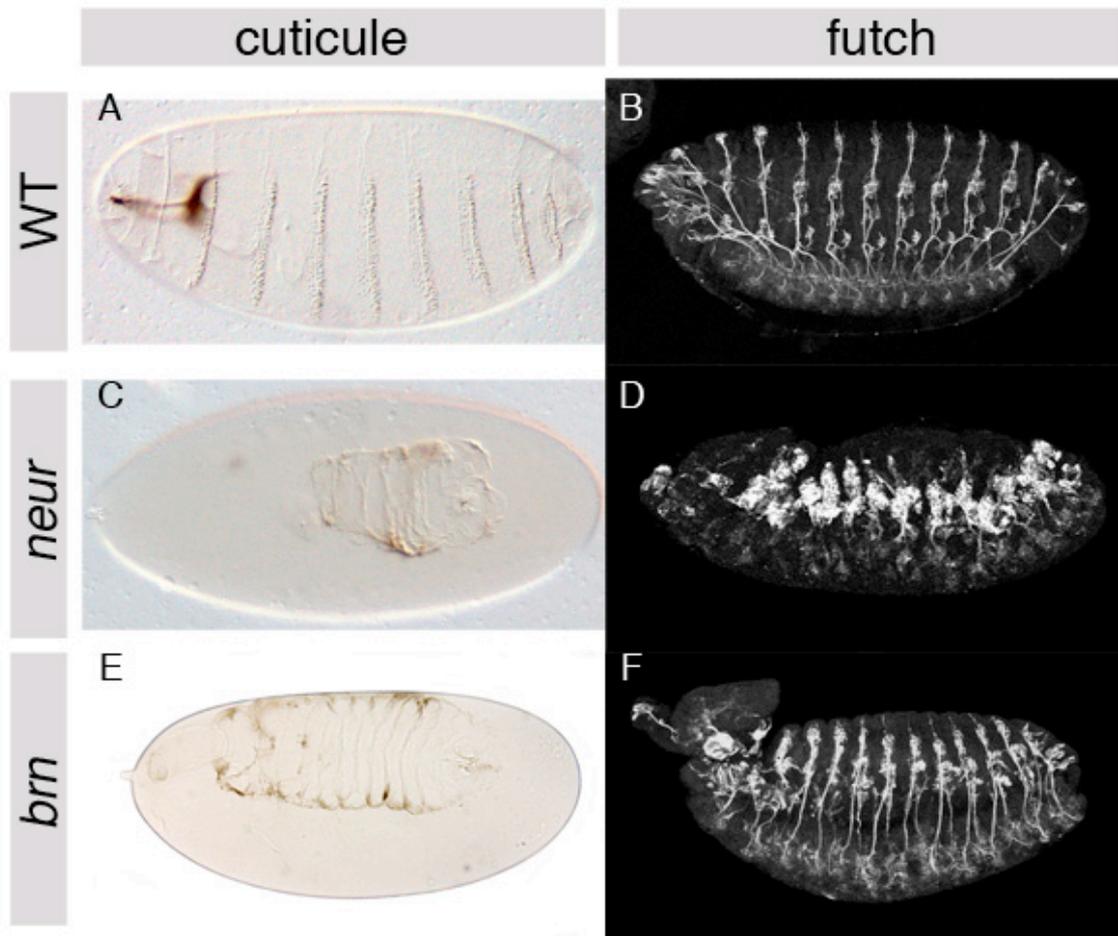


Figure 9 : Le défaut de cuticule observé dans les embryons *brn* n'est pas corrélé à un phénotype neurogénique

A-B : Cuticule (A) et système nerveux périphérique marqué par *futch* (B, 22C10) d'embryon sauvage.
 C-D : Les embryons neurogéniques *neur*^{1F65}/*neur*^{PGal4} (notés *neur*) présentent une cuticule atrophiée (C) qui est corrélée à un excès de neurones par rapport aux cellules épidermiques qui sécrètent la cuticule (D).

E-F : Les embryons *brn*^{fs107} (en perte de fonction maternelle et zygotique sont notés *brn*) présentent un phénotype de cuticule atrophiée semblable au mutant *neur* (E à comparer avec C), mais ce défaut de cuticule n'est pas corrélé à un excès de différenciation neuronale (F à comparer avec D).

3.2.2 en revanche, la polarité apico-basale des cellules de l'ectoderme est perturbée dans le mutant *brn*^{fs107}

Le phénotype de cuticule atrophiée des embryons *brn*^{fs107} n'est pas dû à une augmentation de la différenciation neurale par rapport à la différenciation épidermique. Il serait donc plutôt dû à un défaut de sécrétion de la cuticule par les cellules de l'ectoderme. J'ai donc observé l'ensemble de l'ectoderme des embryons en utilisant des marqueurs comme Disc large (Dlg) qui marque les jonctions septées, et Patj qui

marque la région apicale des cellules dans les embryons *brn*^{fs107} (Figure 10). Dans ces embryons *brn*^{fs107} au stade 11, la localisation subcellulaire de Dlg à la membrane basolatérale ne semble pas perturbée. En revanche, Patj n'est plus présent à la membrane apicale de groupes de cellules du neurectoderme. Cette disparition apicale n'est pas corrélée à une relocalisation vésiculaire ou plus basale.

La mise en place de la polarité apico-basale après la cellularisation de l'embryon n'étant pas perturbé (non montré), il semble que *brn* joue un rôle dans le maintien de la polarité apico-basale des cellules du neurectoderme. Après leur spécification, les neuroblastes délaminent de la couche de cellules ectodermiques. Ce phénomène nécessite des réarrangements au niveau des jonctions cellulaires et sensibilise l'épithélium. Dans le mutant *brn*, la polarité apicale ne semble pas être maintenue dans cet épithélium. Ces résultats sont très préliminaires et ce phénotype doit être caractérisé plus en détail. À partir de quel stade embryonnaire ce phénotype est-il détectable ? Y-a-t-il une corrélation avec la délamination des neuroblastes ? Quant est-il de la localisation des autres marqueurs de la polarité apico-basal ?

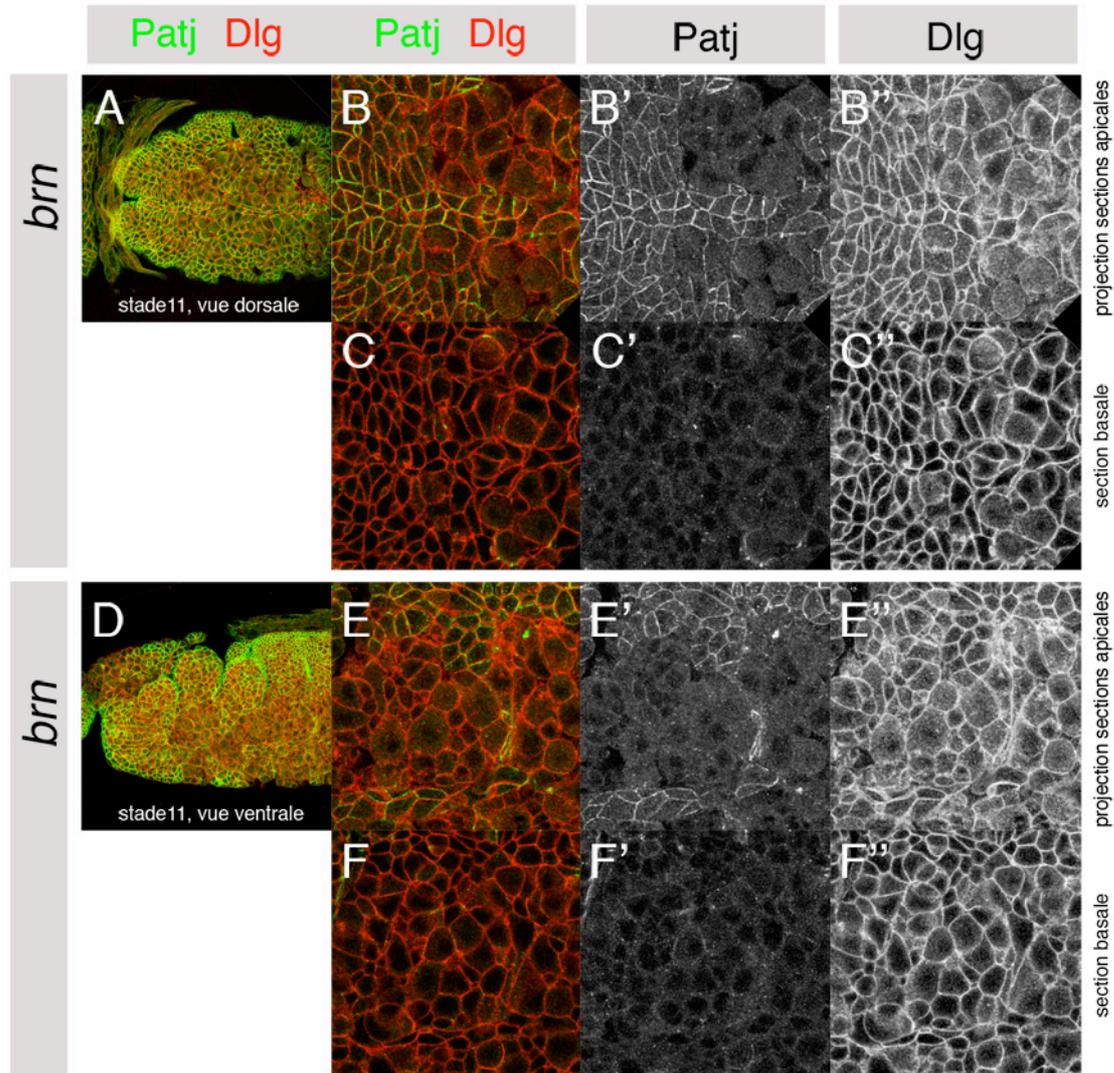


Figure 10 : La localisation apicale de Patj est perturbée dans certaines cellules du neurectoderme des embryons *brn* alors que le marqueur basolatéral Disc large n'est pas perturbé

Deux embryons présentant un défaut maternel et zygotique d'activité *brn* (sans contrôle sauvage) montrent un phénotype dans la localisation apicale de Patj dans certaines cellules du neurectoderme dorsal (A-C'') et du neurectoderme ventral (D-F'').

A-C'' : Vue dorsale d'un embryon de stade 11. Les panneaux B-B'' montrent la projection de 3 sections apicales, et les panneaux C-C'' montrent un plan plus basal. Certaines cellules ont perdu Patj à la membrane apicale, mais Dlg ne semble pas perturbé dans ces mêmes cellules (B'', C'').

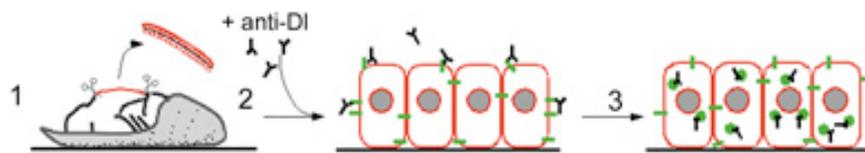
D-F'' : L'observation est la même au niveau du neurectoderme ventral. Patj est perdu dans certaines cellules alors que Dlg n'est pas perturbé.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Tests d'endocytose in vivo

Le tissu vivant est incubé avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de DI. Une chasse d'une durée variable à 25°C permet l'internalisation du complexe DI/ anticorps. Le taux d'internalisation c'est-à-dire la quantité d'anticorps internalisé pendant le temps de la chasse est mesuré après fixation.

1.1 Test d'endocytose dans le notum –Figure 5 de l'annexe du chapitre 2



Les notum sont disséqués à 15h APF (After Puparium Formation), c'est-à-dire après specification des SOP mais avant la première division. La dissection est faite dans du milieu de culture cellulaire Schneider (milieu S2) à température ambiante (étape 1 du schéma). Ils sont ensuite incubés 2 min avec l'anti-Delta ECD (dirigé contre la partie extracellulaire de Delta, Mouse anti-DeltaECD ascite C594.9B, DSHB) à une concentration de 1/500 dans du milieu S2 (étape 2). Les notum sont ensuite rincés plusieurs fois de suite avec du S2 et laissés 13 min en milieu S2 (étapes 3), puis fixés en 4%PFA. Après fixation, les conditions classiques d'immunomarquage sont utilisées. L'anticorps primaires GP anti-Sens (1/5000) est utilisé pour révéler les SOP.

Rq: Ce protocole avec un pulse de 2min et une chasse de 13 min, l'anti-Delta étant à une concentration de 1/500 correspond au protocole utilisé dans les expériences

présentées dans les annexes. Les résultats présentés dans le papier correspondent à un pulse de 8 min sans chasse, l'anti-Delta étant à 1/50.

1.2 Test d'endocytose dans le notum avec un anticorps anti-Delta directement couplé à un fluorochrome (kit Zenon, Figure 5 D de l'annexe du chapitre 2)

Le kit Zenon (invitrogen) permet de coupler les anticorps primaires à des fluorochromes. Un même anticorps primaire peut alors être couplé à différents fluorochromes et utilisé successivement dans le même tissu.

Couplage anticorps/ fluorochrome : L'anti-Delta ECD (concentré C594.9B, DSHB) est incubé avec le fragment Fab couplé au fluorochrome Alexa Fluor 647 dans un rapport volumique de 1/2 pendant 5min à température ambiante pour permettre au Fab d'interagir avec l'IgG. 3 volumes d'une solution bloquante contenant un mélange d'IgG non spécifiques sont ajoutés et incubé 5min au mélange anticorps/ fluorochrome. La solution est ensuite diluée pour que l'anti-DI soit à 1/500 dans le milieu S2. Le couplage de l'anti-DI avec l'Alexa Fluor 488 se fait de la même façon, mais l'anticorps est au final 5 fois plus concentré (dilué au 100^{ème}) dans le milieu S2.

Test d'endocytose : Les notum sont disséqués à 15APF dans du milieu S2, incubés 2 min avec l'anti-DI-A647 au 1/500, rincés pendant 5min dans du S2, incubés 2 min avec l'anti-DI-A488 au 1/100, rincés pendant 3min dans du S2, puis fixés. La fixation intervient donc entre 10 et 12 min après l'internalisation du premier pool de DI marqué par A647, et entre 3 et 5 min après l'internalisation du pool de DI marqué par A488. Après fixation, les conditions classiques d'immunomarquage sont utilisées pour révéler les SOP (anti-Sens au 1/5000).

1.3 Particularités du test d'endocytose sur disque imaginal d'aile

Le disque imaginal d'aile est une structure en forme de sac composée de deux couches épithéliales, celle des cellules péripodiales (épithélium squameux simple) et celles de l'épithélium de l'aile en tant que tel (épithélium colonnaire simple). La face apicale des cellules de l'épithélium de l'aile est orientée à l'intérieur de cette structure en sac et est donc peu accessible aux anticorps sans perméabilisation des membranes par un détergent. Pour permettre aux anticorps d'accéder à la face apicale des cellules je pipette 5 fois les disques d'ailes après dissection afin d'étirer les cellules péripodiales, ensuite je les passe à 4°C pour relâcher les jonctions adhérentes.

Les disques d'aile sont donc disséqués en milieu de culture S2, pipettés 5 fois avant de passer 2h à 4°C dans la solution d'anticorps anti-DI ECD (concentré C594.9B, DSHB, 1/50). Les disques sont ensuite rincés avec du milieu S2 et passés à 25°C pendant 30min, puis fixés. Après fixation, les conditions classiques d'immunomarquage sont utilisées pour marquer le DI total ou la membrane avec Dlg.

2 Construction des plasmides p(MT)WB-Ser[1-288]-6xHis et p(MT)WB-Ser[1-288]^{W/A}-6xHis qui vont permettre l'expression inductible en cellule S2 des polypeptides SerNter

Les plasmides permettant l'expression du domaine N-terminal de Ser, correspondant aux domaines N1, N2 et DSL et noté Ser[1-288], fusionné au tag 6xHis, ont été créés par une stratégie classique de clonage par PCR à partir du plasmide pMT(WB)-Ser[1-1213]:AP (Figure 11,A, (Xu, Lei et al. 2005)) qui contient un promoteur métallothionéine et une cassette de résistance à la blasticidine.

Ser[1-288] a d'abord été amplifié par PCR (846 NT) avec les primers pr et pf, en introduisant le site de restriction EcoRI (en minuscule dans la séquence) sur le

primer pr (GGCCgaattcATGTACAAAATGTTTAGGAAAC), et le tag 6xHis (en rouge dans la séquence) suivi d'un codon stop et du site XhoI (en minuscule dans la séquence) sur le primer pf (CCGGctcgagTTAATGGTGATGGTGATGGCAGTTGACGCCCTGCCAGC). La version mutée Ser[1-288]^{W/A} a été créée en deux temps. Les fragments pr / mf et mr / pf (Figure 11 A) ont été amplifiés par PCR, la substitution W/A étant introduite au niveau des primers mr et mf (mr : cgacttcgtCGCACGAAACGTAAAGGGCAG, mf : CTGCCCTTTACGTTTCGTGCGacgaagtcg, la mutation est indiquée en rouge, et la partie chevauchante des primers est en minuscule dans les séquences). Puis en amplifiant entre pr et pf à partir des deux produits PCR précédents qui se chevauchent sur 9NT.

Les produits PCR Ser[1-288] et Ser[1-288]^{W/A} sont ensuite introduits dans le plasmide pMT(WB) au niveau des sites EcoRI/XhoI. Les plasmides pMT(WB)-Ser[1-288] et pMT(WB)-Ser[1-288]^{W/A} ainsi obtenus ont ensuite été vérifiés par digestion et séquencés (Figure 11 B).

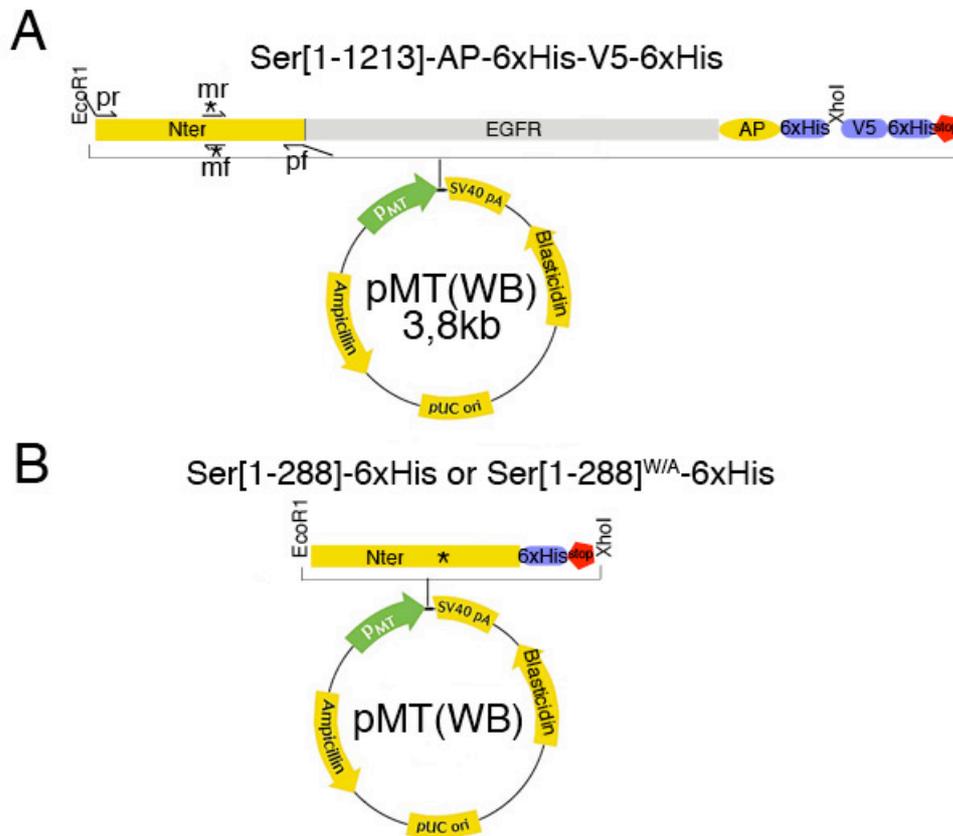


Figure 11: Construction des plasmides p(MT)WB-Ser[1-288]-6xHis et p(MT)WB-Ser[1-288]^{W/A}-6xHis

A : Structure du plasmide pMT(WB)-Ser[1-1213]:AP. Le plasmide pMT(WB) est constitué d'un promoteur métallothionéine (pMT), d'une séquence de polyadénylation (SV40 pA), d'une cassette de résistance eucaryote à la blasticidine (Blasticidin), d'une origine de réplication procaryote (pUC ori), et d'un cassette de résistance procaryote à l'ampiciline (Ampicilin). La partie extracellulaire de Ser [1-1213] fusionnée à l'akaline phosphatase (AP) et au tag 6xHis est insérée entre les sites de restriction EcoRI et XhoI.

Les positions relatives des primers pr, pf, mr et mf sont indiquées par des flèches. Le site de substitution W/A du motif GBM est indiqué par un astérisque

B : Structure des plasmides pMT(WB)-Ser[1-288]-6xHis et pMT(WB)-Ser[1-288]^{W/A}-6xHis. La structure du pMT(WB) est inchangé. Le domaine Nter de Ser fusionné au tag 6xHis est inséré au niveau des sites de restriction EcoRI et XhoI.

3 Production des polypeptides Ser[1-288] et Ser[1-288]^{W/A} en cellules S2 et purification

Des cellules S2 ont été transfectées selon le protocole Effectene de Quiagen (2×10^6 cellules, $1 \mu\text{g}$ d'ADN, $148 \mu\text{l}$ d'effectene et $8 \mu\text{l}$ d'enhancer par boîte transfectée). Après deux jours, les cellules transfectées sont passées sous pression de sélection dans un milieu contenant de la blasticidine à 25ng/ml . L'expression des polypeptides Ser[1-288] est induite avec $5 \mu\text{M}$ de cadmium pendant 10 jours dans un milieu sans sérum (Insect Express, Lonza + blasticidine) (spinner de 500ml jusqu'à une concentration autour de $7 \cdot 10^6$ cellules/ml). Le surnageant est filtré sur une cassette de 10kDa et concentré à un volume final de 80ml. La purification se fait sur une colonne de 1ml de résine Talon superflon (Clontech) et l'élution avec un gradient d'imidazole. Après l'analyse des fractions par coomassie, 10 fractions de 1ml sont regroupées, et concentrées sur 3ml (amikon 3kDa Milipore). Les polypeptides sont ensuite filtrés sur gel pour passer dans une solution PBS1X (Hiload 16/60 Superdex 75, GE Healthcare), puis reconcentrés (Amikon 3kDa) et quantifiés par dosage BCA. Leur profil de migration est analysé par un coomassie sur gel 12% (Figure 12).

Pour Ser[1-288] on obtient un rendement de 1,2mg pour 500ml de culture avant concentration, puis 1ml à $0,94 \text{mg/ml}$ après concentration. Pour Ser[1-288]^{W/A} on obtient un rendement de 2,6mg pour 500ml de culture avant concentration, puis 2ml à $1,13 \text{mg/ml}$ après concentration.

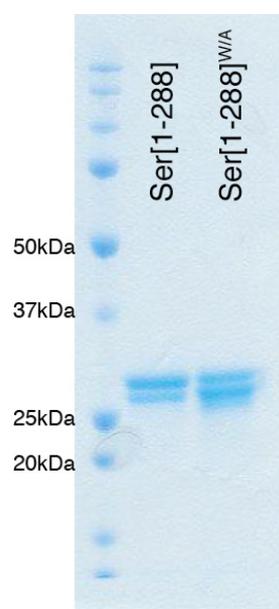


Figure 12 : Profil de migration des polypeptides Ser[1-288] et Ser[1-288]^{W/A} après purification et concentration (révélé par une coloration au bleu de coomassie)

Ser[1-288]: $5 \mu\text{g}$

Ser[1-288]^{W/A}: $6 \mu\text{g}$

La taille des polypeptides est de 218 acides aminés une fois que le peptide du signal de 70 acides aminés est clivé. Cela correspond à un poids théorique de 24kDa si on considère qu'un acide aminé correspond à 110Da.

On observe sur les profils de migration deux bandes autour de 27kDa. Une partie au moins des polypeptides a donc subi une modification post-traductionnelle.

4 Préparation de DRM d'embryons de drosophile sur gradient de sucrose

Des embryons 4-6h (stades 10-12) sont déchorionnés, lavés extensivement dans du 0.9% NaCl 0.1% Triton X-100, puis dans de l'eau, et transféré dans des tubes eppendorph 1,5ml. Après avoir enlevé l'eau résiduelle par une brève centrifugation, les embryons sont aliquotés, congelés dans un mélange éthanol-carboglace, et stockés à -80°C. 0.25mg d'embryons sont broyés avec un Potter-Elvehjam dans 1ml de tampon A (20mM Hepes, pH=7; 150mM NaCl) contenant 1% de Brij 98. L'homogénat d'embryons est gardé à 4°C (sur la glace) 30min le temps de la solubilisation, puis est mélangé avec 1ml de tampon B (85% sucrose + 1% Brij 98 dans du tampon A) avant d'être transféré dans un tube de centrifugation pré-refroidi. Le gradient de densité est constitué en ajoutant 2ml du tampon A à 30% de sucrose, et 1ml du tampon A à 5% de sucrose toujours à 4°C. Après 16h de centrifugation à 230 000g (ultracentrifugeuse XL-90 Beckmann, Rotor SW50.1, Godets n°38.0) et à 4°C, des fractions de 500µl sont collectées et numérotées de 1 à 10 (des fractions légères aux fractions lourdes) et analysées par western blot (gel gradient 4-12%, et membrane PVDF). Les anticorps primaires suivants sont utilisés: goat anti-Dl^{ICD} (1/100, dc-19, Santa Cruz), mouse anti-Notch^{ICD} (1/100, C17 9C6, DSHB), mouse anti-syntaxin1A (1/200, 8C3, DSHB), mouse anti- α tubulin (1/10,000, DM1 α , Sigma). L'anticorps secondaire Amersham couplé à la HRP (anti-mouse : 1/10,000 ; anti-goat : 1/50,000) ainsi que le kit de détection ECL sont utilisés.

Conclusions et Discussion

Dans cette partie, je discute les résultats du crible et de l'étape d'identification des interacteurs génétiques de *mib1* issus du crible, les résultats concernant l'analyse du rôle d' α 4GT1 dans la signalisation Notch et enfin le rôle potentiel de *brainac* dans le maintien de la polarité apicale des cellules dans l'embryon.

1 Analyse des résultats du crible

1.1 Les avantages et les inconvénients d'une approche en gain de fonction

L'ubiquitination et l'endocytose des ligands Delta et Serrate sont essentiels à leur activité signalisatrice chez la drosophile, et Mib1 est l'ubiquitine ligase indispensable à ce processus dans l'aile. Afin d'essayer de mieux comprendre le rôle de l'ubiquitination des ligands dans la signalisation Notch, j'ai réalisé un crible génétique pour identifier de nouveaux acteurs impliqués dans ce processus. J'ai plus précisément sélectionné des gènes qui modifient le phénotype induit par des pertes partielles d'activité *mib1*, quand ils sont surexprimés. Ce type de crible modificateur en surexpression permet d'identifier les acteurs manquant d'une voie de signalisation. En effet, quand la transduction du signal est perturbée par une inactivation partielle d'un acteur important d'une voie de signalisation comme *mib1*, le niveau d'expression des autres acteurs peut devenir important et révéler leur fonction. De plus, beaucoup de gènes ne sont pas essentiels, soit en raison d'une redondance génétique, existence d'homologues, soit en raison d'une redondance fonctionnelle, qui est facilement envisageable dans des processus robustes et flexibles comme l'endocytose (voir la partie 2.1.4. de l'introduction). La fonction de ces acteurs non essentiels peut être masquée par des approches en perte de fonction à cause de ces différents types de redondance, et au contraire révélée par des approches en gain de fonction. L'inconvénient d'un crible en gain de fonction est donc bien sûr, l'absence potentielle de phénotype qui complique l'analyse de la fonction et des mécanismes d'action des candidats issus du crible. L'analyse de la

fonction d' α 4GT1 dans la signalisation Notch illustre bien ces difficultés. Elles peuvent toutefois être dépassées par des analyses quantitatives d'interactions génétiques en perte de fonction, qui permettent de valider l'implication d'un candidat dans un processus biologique et d'écartier l'hypothèse d'un artéfact de surexpression, ainsi que par des approches biochimiques et biophysiques, qui permettent d'investiguer plus en profondeur les mécanismes d'action.

Une collection de 4180 lignées GS permettant l'expression ectopique de leurs gènes adjacents a été criblée. 98 lignées GS ont été sélectionnées comme étant des supprimeurs du phénotype induit par la surexpression du dominant négatif Mib1^{C1205S}, et parmi ces 98 lignées, 14 lignées GS ont été sélectionnées pour leur capacité à modifier en le sauvant ou en l'aggravant le phénotype induit par *mib1*^{RNAi}. Chaque lignée GS pouvant modifier l'expression de plusieurs gènes adjacents grâce à des promoteurs bidirectionnels, l'étape suivante consistait à identifier les gènes responsables de l'interaction avec *mib1* pour chacune des 14 lignées GS sélectionnées. Une liste de gènes, orientés dans le sens des promoteurs des GS et dans une fenêtre de 10kb autour de leur point d'insertion, et donc potentiellement surexprimés par ces 14 éléments GS a été établie. J'ai ensuite choisi d'utiliser les lignées RNAi dirigées contre ces gènes candidats pour tester la nécessité de leur expression pour le sauvetage du phénotype Mib1^{C1205S} par chacun des GS. Cette stratégie m'a permis d'identifier α 4GT1 et Hsc70-4 comme étant des interacteurs génétiques de *mib1*.

1.2 L'effet d'interférence des GS sur l'expression des gènes adjacents orientés dans le sens inverse des promoteurs des GS a-t-il été sous-estimé ?

Il est difficile de juger de l'efficacité de la stratégie d'identification des interacteurs de *mib1* issus du crible en bloquant l'expression des gènes candidats par RNAi, car les candidats de la majorité des lignées GS n'ont pas pu être testés de façon

systematique, certains gènes n'ayant pas de lignée RNAi, et certaines lignées RNAi n'ayant pas été recombinaées avec leur GS respectif. L'identification $\alpha 4GT1$ et *Hsc70-4*, comme étant responsable de l'interaction des GS2078 et GS13030 avec *mib1*, montre toutefois que cette stratégie peut permettre d'identifier des gènes dont l'expression est nécessaire au sauvetage.

Pour 3 lignées GS (GS7314, GS12332, et GS22994), les lignées RNAi de tous les gènes candidats ont été testées de façon exhaustive. Aucune lignée RNAi ne s'est révélée capable de bloquer ou de diminuer le sauvetage du phénotype *Mib1*^{C1205S} par ces GS. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce résultat. D'abord, seuls les gènes potentiellement surexprimés ont été considérés dans la liste de gènes candidats. Les gènes orientés dans le sens inverse des promoteurs des GS ont été exclus car le transcrit anti-sens des gènes orientés dans le sens inverse des promoteurs des GS n'est pas détecté par De Celis et al (Molnar, Lopez-Varea et al. 2006). Mais ce n'est pas parce qu'il n'est pas détecté, qu'il n'existe pas, et qu'il n'a pas un effet d'intertérence sur l'expression de ces gènes. L'interaction avec *mib1* pourrait donc être due dans certains cas à la diminution du niveau d'expression d'un gène orienté dans le sens inverse des promoteurs. Cette hypothèse peut facilement être testée en utilisant les lignées RNAi des gènes orientés dans le sens inverse des promoteurs du GS et en testant leur capacité à sauver le phénotype *Mib1*^{C1205S}. Il est aussi possible que le niveau de production des RNAi ne soit pas suffisant par rapport au niveau de surexpression induit par les GS, et qu'il ne permette pas de diminuer significativement l'expression ectopique des gènes adjacents. Pour augmenter le niveau de production des RNAi, les nouvelles lignées RNAi KK conçues pour optimiser le niveau d'expression des constructions RNAi pourraient être utilisées, ainsi que la surexpression de *Dicer2* qui permet d'augmenter l'efficacité du processus d'interférence avec l'expression du gène ciblé.

1.3 Rôle potentiel de Hsc70-4 dans le trafic et la signalisation des ligands de Notch

La surexpression de *Hsc70-4* est nécessaire au sauvetage du phénotype *Mib1*^{C1205S} par le GS13030. La lignée UAS-*Hsc70-4* (flybase) va permettre de tester si l'expression de *Hsc70-4* est suffisante pour le sauvetage du phénotype induit par *Mib1*^{C1205S}, et si, comme le GS13030, elle aggrave le phénotype *mib1*^{RNAi}. Les différents allèles mutants (flybase), les lignées RNAi-KK (ID 101734) et UAS vont permettre d'analyser la fonction de *Hsc70-4* dans la signalisation Notch dans l'aile et le notum, dans la localisation subcellulaire de *Mib1* et des ligands DSL, ainsi que dans l'internalisation des ligands DSL. Les lignées UAS des différents membres de la famille Hsc70 (*Hsc70-1* à *5*) étant disponible, leur capacité à sauver le phénotype induit par *Mib1*^{C1205S} sera testé. Pour tester génétiquement la spécificité de la fonction de *Hsc70-4* vis-à-vis des ubiquitine ligases *Mib1* et *Neur*, la capacité de *Hsc70-4* à sauver le phénotype induit par la surexpression du dominant négatif *Neur*^{C701S} dans l'aile sera testée. Si la surexpression de *Hsc70-4* sauve le phénotype dans l'aile induit par *Mib1*^{C1205S} et pas celui induit par *Neur*^{C701S} cela suggère une spécificité d'interaction. L'interaction physique cette fois, entre *Hsc70-4* et *Mib1*, pourra être testée.

Hsc70-4 est une ATPase (Schlossman 1984, Hannan 1998, Holstein 1996) impliquée dans la régulation de la dynamique du manteau de clathrine à différentes étapes de l'endocytose des ligands. Elle pourrait jouer un rôle au niveau de l'initiation et de la nucléation du manteau de clathrin, au niveau de l'invagination, de la constriction, et de la scission de la vésicule de clathrine, et aussi au niveau du recyclage de la clathrine. Il est difficile de dissocier ces différentes étapes. Néanmoins, il est possible de chercher les partenaires de *Hsc70-4* importants pour sa fonction dans la signalisation DSL. L'effet de la surexpression par UAS de l'Auxilin, un cofacteur de *Hsc70-4* (Ungewickell 1995, Umeda 2000), et celle de la chaîne lourde de la clathrin (*Eun*) sur les phénotypes induits par *Mib1*^{C1205S} seront analysés dans l'aile. Leur potentiel effet synergique avec la surexpression de *Hsc70-4* sera testé en les co-surexprimant dans des contextes sensibilisés pour l'endocytose des ligands.

1.4 Rôle potentiel de Tacc dans le trafic et la signalisation des ligands de Notch

tacc est le seul candidat dans une fenêtre de 25kb autour du GS13211 qui sauve les phénotypes de défaut d'activité *mib1* induit par *Mib1*^{C1205S} et *mib1*^{RNAi}. La nécessité de sa surexpression dans ce sauvetage n'a pas pu être testée car aucune lignée RNAi n'était disponible. Une nouvelle lignée RNAi-KK (ID101439) est maintenant disponible et va permettre de tester l'effet du blocage de l'expression de *tacc* sur le sauvetage de *Mib1*^{C1205S} par le GS13211. Si le RNAi empêche le sauvetage du phénotype *Mib1*^{C1205S} par le GS cela montrera que la surexpression de *tacc* est nécessaire à l'interaction avec *mib1*. Une lignée UAS (Gergely et al. 2000) va aussi permettre de tester si la surexpression de *tacc* est suffisante à la restauration de la signalisation Notch dans le contexte *Mib1*^{C1205S}. Tacc est un régulateur de la polymérisation des microtubules impliqué dans l'organisation du fuseau mitotique (Gergely et al. 2000). Il pourrait avoir une fonction dans le trafic membranaire dans les cellules interphasiques indépendamment de sa fonction pendant la mitose.

2 Analyse du rôle d' α 4GT1 dans la signalisation Notch

L'identification des interacteurs génétiques de *mib1* issus du crible n'ayant pas été très efficace je n'ai pas vraiment choisi de travailler sur le rôle d' α 4GT1 dans la signalisation Notch. α 4GT1 a été le premier interacteur identifié, *Hsc70-4* ne l'a été qu'à la fin de ma thèse. Les données bibliographiques autour du rôle des GSLs dans l'endocytose et potentiellement dans la signalisation Notch étaient intéressantes et m'ont encouragé à commencer l'analyse de la fonction d' α 4GT1 en parallèle du crible.

2.1 α 4GT1 est un régulateur positif de la signalisation Notch

Le crible a permis l'identification d' α 4GT1 comme étant un régulateur positif, mais non essentiel, de la signalisation Notch. La surexpression d' α 4GT1 sauve les phénotypes associés à des inhibitions ou à des pertes partielles d'activité *neur* et/ou *mib1* dans le contexte de la mise en place de la marge de l'aile et dans celui de la mise en place des organes sensoriels du notum chez la drosophile. La perte de fonction d' α 4GT1 n'a pas de conséquences phénotypique détectable, mais aggrave une perte partielle d'activité Notch. Cette interaction génétique en perte de fonction confirme qu' α 4GT1 joue un rôle positif dans la signalisation Notch.

2.2 La fonction d' α 4GT1 dans la signalisation Notch implique la production du GSL N5

L'analyse par chromatographie a montré qu' α 4GT1 était à la fois nécessaire et suffisant à la production du GSL N5 à partir de N4. De plus, le sauvetage du phénotype associé à *mib1^{RNAi}* par α 4GT1 nécessite les activités des enzymes Egh et

Brn qui agissent en amont dans la voie de biosynthèse des GSLs pour la production de N2 et N3. Le mannose et le glucose ajoutés respectivement par Egh et Brn produisent un lactose terminal qui n'a jamais été retrouvé sur des protéines (North et al., 2006) et semble spécifique des GSLs (Seppo et al., 2000). On peut donc écarter la possibilité d'un substrat protéique commun à Egh, Brn et α 4GT1 qui serait responsable de l'effet positif d' α 4GT1 sur la signalisation Notch. La production du GSL N5 à partir de N4 est donc vraisemblablement responsable du rôle positif d' α 4GT1 sur la signalisation Notch.

2.3 Même s'il ne semble pas essentiel, le rôle modulateur des GSLs dans la signalisation Notch est conservé à travers l'évolution

La surexpression d' α 4GT1 et l'augmentation du niveau de N5 compensent les réductions d'activité ubiquitine ligase en promouvant l'endocytose de DI. L'effet positif d' α 4GT1 sur la signalisation Notch n'est mis en évidence que dans des contextes où l'activité de Notch est réduite. Cette situation est très semblable à celle observée chez *C. elegans*. En effet, des interactions génétiques chez le ver montrent que les pertes de fonction de *bre-3* et *bre-5*, homologues d'*egh* et *brn*, agissent comme des suppresseurs récessifs d'un allèle gain de fonction de *lin-12*, un membre de la famille Notch (Katic, Vallier et al. 2005). Cette interaction génétique suggère un rôle positif des GSLs sur la signalisation *lin-12*, tout comme mes résultats suggèrent un rôle positif des GSLs sur l'endocytose de DI et la signalisation Notch. Comme *α 4GT1*, *bre-3* et *bre-5* ne sont pas essentiels chez *C. elegans*. Leur perte de fonction ne présente pas de phénotype, à l'exception de la résistance à la toxine du *Bacillus thuringiensis* qui n'est plus internalisée dans les cellules intestinales (Griffitts, Whitacre et al. 2001).

2.4 Comment expliquer que l'absence d' $\alpha 4GT1$ n'ait pas de conséquences ?

En effet, aucun phénotype n'a pu être mis en évidence dans le mutant $\alpha 4GT1$, à l'exception de la forte diminution du marquage de la lectine HPA qui montre qu' $\alpha 4GT1$ est bien actif in vivo et de l'aggravation du phénotype associé à l'haploinsuffisance de Notch. $\alpha 4GT1$ a un paralogue, $\alpha 4GT2$, et aucun phénotype n'a non plus été détecté dans le double mutant $\alpha 4GT1 \alpha 4GT2$. Comment expliquer alors que l'absence de N5 n'ait pas de conséquences, ou plus précisément, que l'absence de N5 n'ait de conséquence que dans contexte sensibilisé où l'activité de Notch est diminuée ? La composition lipidique des membranes étant complexe et les interconnexions entre les différentes voies de biosynthèse étant encore mal connues, on peut imaginer une redondance fonctionnelle au niveau lipidique qui compenserait pour l'absence de N5. Une analyse qui combine une approche génétique à de la spectrométrie de masse, a montré chez la levure que les cellules ajustaient leur composition membranaire en réponse à des mutants de la voie de biosynthèse des stérols en modulant leur composition en sphingolipides (Guan, Riezman, Mol Biol of the cell 2009). On peut donc imaginer que le mécanisme inverse soit possible et que les cellules de drosophile compense l'absence de N5 en activant par exemple l'import de stérol.

2.5 $\alpha 4GT1$ agit-il sur la signalisation Notch au niveau de la cellule signalisatrice et des ligands, ou au niveau de la cellule signalisatrice et du récepteur Notch ?

Tout d'abord, la production de N5 par $\alpha 4GT1$ se fait de façon autonome cellulaire. En effet, la lectine HPA ne détecte pas de produit d' $\alpha 4GT1$ au niveau des cellules qui entourent le clone surexprimant $\alpha 4GT1$.

On peut ensuite se demander si l'augmentation du niveau de N5 agit au niveau des ligands et de leur activité signalisatrice ou au niveau du récepteur.

Un motif potentiel d'interaction aux GSLs a été identifié dans la partie extracellulaire de Notch, sans avoir été testé *in vitro*. Et le complexe γ -sécrétase, qui est retrouvé *in vivo* dans des domaines résistants aux détergents (Vetrivel et al. Thinakaran, 2004), est activé *in vitro* par un microenvironnement lipidique enrichi en sphingolipide et cholestérol (Osenkowiak et al. 2008). On peut donc imaginer que l'augmentation du niveau de N5 change la distribution et l'organisation des lipides à la membrane, entraînant la formation de nanodomains spécifiques et le regroupement de Notch et de la γ -sécrétase dans des nanodomains enrichis en N5 ce qui faciliterait le clivage et l'activation de Notch.

Néanmoins si N5 agissait directement au niveau du clivage de Notch, on ne s'attend pas à ce que l'expression d' α 4GT1 sauve la localisation subcellulaire et l'endocytose des ligands. En effet, la surexpression de la forme activée de Notch, NICD, sauve la spécification de la marge de l'aile dans le contexte du dominant-négatif Mib1^{C1205S} (Figure 1 du papier du crible), sans sauver la localisation subcellulaire des ligands DI et Ser dans ce contexte (non montré). En plus, le rôle potentiel de N5 dans la promotion de l'endocytose de DI est en accord avec le fait que chez *C.elegans*, bre-5 ait un effet non autonome sur la signalisation Notch, et avec le fait que Delta-like 1 soit retrouvé dans des domaines membranaires résistants aux détergents dans des cellules de mammifère (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008).

Tester directement l'autonomie de l'effet d' α 4GT1 sur la signalisation Notch est assez compliqué, l'activité d' α 4GT1 n'étant détectable que dans un contexte d'activité ubiquitine ligase réduite. Il faudrait générer des clones de cellules surexprimant α 4GT1 dans un tissu où l'activité ubiquitine ligase est réduite.

2.6 Comment l'augmentation du niveau de N5 peut-il compenser la réduction d'activité ubiquitine ligase et restaurer l'endocytose et l'activité signalisatrice des ligands ?

J'ai pu observer dans différents contextes d'inhibition et ou de blocage des activités ubiquitine ligase de Mib1 et Neur que la surexpression d' α 4GT1 restaure

l'endocytose normale de DI. On peut alors imaginer que N5 régule positivement l'endocytose de DI. La surexpression d' $\alpha 4GT1$ n'ayant pas d'effet détectable sur l'endocytose de DI en contexte sauvage, cet effet n'a pu être observé que dans des contextes sensibilisés dans lesquels l'endocytose des ligands était initialement perturbée.

Plusieurs modèles peuvent être avancés :

2.6.1 L'augmentation du niveau de N5 pourrait avoir un effet général sur l'endocytose

En effet, on sait que l'interaction de la toxine Shiga avec le GSL Gb3 induit des réarrangements lipidiques en faveur d'une courbure négative de la membrane qui entraîne la formation de tubules aussi bien dans des systèmes de membranes modèles qu'en cellule (Romer, Berland et al. 2007) (voir la partie 3.6.2 de l'introduction, Figure 15). On peut alors imaginer qu'une augmentation du niveau de N5 à la membrane plasmique suffise pour augmenter mécaniquement le niveau général d'endocytose. Cette hypothèse n'a pas été testée *in vitro* sur des membranes synthétiques, mais *in vivo*, aucune augmentation significative de l'internalisation de dextran, un marqueur de la phase fluide, ou de FM4-64, un marqueur lipophile, n'a été détectée quand $\alpha 4GT1$ est surexprimé (données non montrées).

2.6.2 L'augmentation du niveau de N5 pourrait indirectement permettre de restaurer l'ubiquitination des ligands

L'augmentation du niveau de N5 pourrait indirectement permettre de restaurer l'ubiquitination des ligands, en augmentant l'activité des ubiquitine ligases Mib1 et Neur, ou en inhibant un régulateur négatif de ces enzymes comme une déubiquitinase par exemple. L'ubiquitination de ligands endogènes n'ayant jamais été montrée *in vivo*, il est difficile d'imaginer pouvoir quantifier leur niveau d'ubiquitination dans une condition où l'endocytose des ligands est bloquée par une réduction de l'activité des ubiquitine ligases et dans une condition où l'endocytose des ligands est restauré par l'expression d' $\alpha 4GT1$. Quoi qu'il en soit, l'augmentation

du niveau de N5 n'est pas capable de passer outre une totale absence d'ubiquitination des ligands.

2.6.3 L'augmentation du niveau de N5 pourrait favoriser le regroupement des ligands dans des nanodomains membranaire et faciliter leur endocytose

L'augmentation du niveau de N5 pourrait changer la distribution et l'organisation des lipides à la membrane, entraînant la formation de nanodomains spécifiques et le regroupement des ligands dans des nanodomains enrichis en N5 ce qui faciliterait leur endocytose et donc leur activité signalisatrice.

L'identification d'un GBM, conservés chez les mammifères, dans le domaine extracellulaire des ligands, et qui interagit *in vitro* avec les GSLs supporte cette hypothèse. La fonction de ce GBM reste à tester *in vivo*, mais des mutations associées au syndrome Alagille et identifiées dans le GBM de Jagged1, homologue de Ser chez les mammifères, suggèrent que ce domaine est important pour l'activité signalisatrice de Jagged1.

2.7 Comment tester *in vivo* la fonction du GBM des ligands ?

Il faudrait pour cela tester à la fois l'interaction entre les ligands et les GSLs via leur domaine GBM, et le rôle de ce domaine GBM dans l'endocytose des ligands.

2.7.1 Peut-on tout d'abord, mettre en évidence *in vivo* une interaction entre le GBM des ligands et les GSLs ?

Une première possibilité aurait été d'isoler biochimiquement des domaines membranaires résistants aux détergents (DRMs) pour tester la présence de DI et celle des GSLs. J'ai tenté d'isoler des DRM à partir d'embryons de drosophile (voir la partie 2. des annexes du chapitre 2), mais sans pouvoir être certaine de l'efficacité de la solubilisation que je réalisais, aucune protéine transmembranaire n'étant totalement solubilisée. Je ne savais pas non plus si les DRM isolés correspondaient

à un compartiment membranaire spécifique ou à des sous-domaines de la membrane plasmique. Et enfin, je n'ai pas testé la présence de GSLs dans les DRM isolés. Ensuite, si cette colocalisation de DI et des GSLs dans les DRMs avait été clairement établi, j'aurais testé deux choses: la localisation de DI dans les DRMs d'embryons mutants pour les enzymes de la voie de biosynthèse des GSLs (*brn^{fs107}* et *α4GT1 α4GT2*); et l'effet de la mutation W/A, qui abolie *in vitro* l'interaction GBM/GSL, sur la localisation de DI dans les DRM.

Des méthodes d'observation directe pourraient aussi permettre de tester l'interaction GBM/GSL, mais sont plus compliquées à mettre en œuvre. On peut par exemple imaginer tester par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) l'interaction entre un analogue fluorescent des GSLs et les ligands de Notch, avec un GBM sauvage ou muté.

2.7.2 Le GBM est-il impliqué dans l'endocytose des ligands ?

L'implication du GBM dans l'endocytose des ligands pourrait être testée en surexprimant la version mutée, au niveau du GBM, des ligands, grâce au système UAS-GAL4. L'activité signalisatrice de la version mutée des ligands pourrait alors être analysée en testant sa capacité à activer Notch, et son trafic pourrait être analysé à steady-state ou en test d'endocytose. Néanmoins, comme le rôle des GSLs dans la signalisation Notch n'est observable que dans des contextes sensibilisés, une analyse de la version mutée des ligands exprimée à des niveaux physiologiques serait plus judicieuse. Pour cela il faudrait générer un BAC qui permet un sauvetage génomique du locus DI et créer une version mutante taggée par recombinaison et transgénèse médiée par phiC31.

3 Le rôle de *brainiac* dans le maintien de la polarité apicale

L'analyse de clones germinaux *egh* et *brn* a montré que ces enzymes étaient requises dans la lignée germinale, pour la maintenance, mais pas la spécification, de l'épithélium folliculaire (Goode et al. 1996). En l'absence d'*egh* et de *brn* dans l'ovocyte, les cellules folliculaires perdent leur forme cuboïdale ou colonnaire et s'accumulent en plusieurs couches de cellules rondes, au lieu de former un épithélium unistratifié (Goode et al. 1996). L' α -spectrine, qui est normalement localisée au niveau des membranes latérales des cellules folliculaires, s'accumule ectopiquement tout autour de la circonférence des cellules folliculaires. La phosphotyrosine (PT) est un marqueur membranaire apical est diminuée ou perdue dans les cellules folliculaires en contact avec l'ovocyte adjacent mutant pour *brn*. Aucun autre marqueur de polarité n'a été testé. Ce phénotype de perte de la polarité cellulaire avaient amené à la conclusion qu'*egh* et *brn* fonctionnaient de façon non autonome cellulaire dans le maintien de la polarité et/ou l'adhésion entre l'ovocyte et l'épithélium folliculaire.

L'analyse du phénotype de *brn*^{fs107} en perte de fonction maternelle dans l'embryon montre un rôle de *brn* dans la localisation apicale de Patj qui est cohérent avec une fonction de *brn* dans le maintien de la polarité apico-basale. Il semble que ce phénotype apparaisse au moment à partie des stades 9-10 dans le neuroépithélium, au moment où des réarrangements des jonctions cellulaires sont nécessaires à la délamination des neuroblastes. Ceci doit être confirmé par une analyse plus précise pour déterminer précisément à quel moment et dans quelles cellules ce phénotype apparaît au cours du développement embryonnaire. D'autres marqueurs apicaux comme Crumbs, Bazooka, aPKC doivent être analysés ainsi que des marqueurs des jonctions adhérentes comme la Cadherin, Armadillo ou Echinoid, et des marqueurs basolatéraux comme Neurotactin et Scribble doivent être analysés dans les mutants *egh* et *brn*.

On peut imaginer que l'absence de *brn* ait des conséquences sur l'endocytose et/ou sur l'adressage apical de certaines protéines, et ces hypothèses devront être testées. Au vue du caractère non autonome de la fonction d'*egh* et *brn* dans le maintien de la polarité des cellules folliculaires, on peut imaginer qu'une interaction entre certains marqueurs apicaux et les GSLs en trans, c'est-à-dire à travers l'espace intercellulaire, soit impliquée dans le maintien de la polarité apico-basale.

Références

- Acar, M., H. Jafar-Nejad, et al. (2008). "Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling." Cell **132**(2): 247-58.
- Allenspach, E. J., I. Maillard, et al. (2002). "Notch signaling in cancer." Cancer Biol Ther **1**(5): 466-76.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-6.
- Bardin, A. J. and F. Schweisguth (2006). "Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in Drosophila." Dev Cell **10**(2): 245-55.
- Barsi, J. C., R. Rajendra, et al. (2005). "Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling." Mech Dev **122**(10): 1106-17.
- Bingham, S., S. Chaudhari, et al. (2003). "Neurogenic phenotype of mind bomb mutants leads to severe patterning defects in the zebrafish hindbrain." Dev Dyn **228**(3): 451-63.
- Bonifacino, J. S., M. S. Marks, et al. (1996). "Mechanisms of signal-mediated protein sorting in the endocytic and secretory pathways." Proc Assoc Am Physicians **108**(4): 285-95.
- Boulianne, G. L., A. de la Concha, et al. (1991). "The Drosophila neurogenic gene neuralized encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons." Embo J **10**(10): 2975-83.
- Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-89.
- Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." Cell **100**(4): 391-8.
- Bulman, M. P., K. Kusumi, et al. (2000). "Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis." Nat Genet **24**(4): 438-41.
- Carrasco-Rando, M. and M. Ruiz-Gomez (2008). "Mind bomb 2, a founder myoblast-specific protein, regulates myoblast fusion and muscle stability." Development **135**(5): 849-57.
- Chanet, S., N. Vodovar, et al. (2009). "Genome engineering-based analysis of bearded family genes reveals both functional redundancy and a nonessential function in lateral inhibition in Drosophila." Genetics **182**(4): 1101-8.
- Chau, V., J. W. Tobias, et al. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-83.
- Chen, L. and N. G. Davis (2002). "Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway." Traffic **3**(2): 110-23.
- Chen, N. and I. Greenwald (2004). "The lateral signal for LIN-12/Notch in C. elegans vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins." Dev Cell **6**(2): 183-92.
- Chen, W. and D. Casey Corliss (2004). "Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis." Dev Biol **267**(2): 361-73.
- Chichili, G. R. and W. Rodgers (2007). "Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton." J Biol Chem **282**(50): 36682-91.
- Childress, J. L., M. Acar, et al. (2006). "Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis." Curr Biol **16**(22): 2228-33.

- Chiu, S. W., M. Clark, et al. (1995). "Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane." Biophys J **69**(4): 1230-45.
- Choe, E. A., L. Liao, et al. (2007). "Neuronal morphogenesis is regulated by the interplay between cyclin-dependent kinase 5 and the ubiquitin ligase mind bomb 1." J Neurosci **27**(35): 9503-12.
- Choudhury, A., M. Dominguez, et al. (2002). "Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells." J Clin Invest **109**(12): 1541-50.
- Collawn, J. F., M. Stangel, et al. (1990). "Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis." Cell **63**(5): 1061-72.
- Crosnier, C., C. Driancourt, et al. (1999). "Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome." Gastroenterology **116**(5): 1141-8.
- D'Souza, B., A. Miyamoto, et al. (2008). "The many facets of Notch ligands." Oncogene **27**(38): 5148-67.
- de Celis, J. F., A. Garcia-Bellido, et al. (1996). "Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc." Development **122**(1): 359-69.
- Deblandre, G. A., E. C. Lai, et al. (2001). "Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling." Dev Cell **1**(6): 795-806.
- Delwig, A. and M. D. Rand (2008). "Kuz and TACE can activate Notch independent of ligand." Cell Mol Life Sci **65**(14): 2232-43.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." Annu Rev Biochem **78**: 399-434.
- Dietzen, D. J., W. R. Hastings, et al. (1995). "Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae." J Biol Chem **270**(12): 6838-42.
- Doherty, D., G. Feger, et al. (1996). "Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation." Genes Dev **10**(4): 421-34.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.
- Dorsky, R. I., W. S. Chang, et al. (1997). "Regulation of neuronal diversity in the Xenopus retina by Delta signalling." Nature **385**(6611): 67-70.
- Edidin, M. (2003). "The state of lipid rafts: from model membranes to cells." Annu Rev Biophys Biomol Struct **32**: 257-83.
- Eggeling, C., C. Ringemann, et al. (2009). "Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell." Nature **457**(7233): 1159-62.
- Ellisen, L. W., J. Bird, et al. (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." Cell **66**(4): 649-61.
- Eun, S. H., K. Lea, et al. (2007). "Identification of genes that interact with Drosophila lipid facets." Genetics **175**(3): 1163-74.
- Feigenson, G. W. and J. T. Buboltz (2001). "Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol." Biophys J **80**(6): 2775-88.

- Fitzgerald, K. and I. Greenwald (1995). "Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo." Development **121**(12): 4275-82.
- Fiuza, U. M. and A. M. Arias (2007). "Cell and molecular biology of Notch." J Endocrinol **194**(3): 459-74.
- Fontana, J. R. and J. W. Posakony (2009). "Both inhibition and activation of Notch signaling rely on a conserved Neuralized-binding motif in Bearded proteins and the Notch ligand Delta." Dev Biol **333**(2): 373-85.
- Franklin, J. L., B. E. Berechid, et al. (1999). "Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch1 and Delta1." Curr Biol **9**(24): 1448-57.
- Frick, M., N. A. Bright, et al. (2007). "Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding." Curr Biol **17**(13): 1151-6.
- Galan, J. M. and R. Haguener-Tsapis (1997). "Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein." EMBO J **16**(19): 5847-54.
- Gallagher, C. M. and J. A. Knoblich (2006). "The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*." Dev Cell **11**(5): 641-53.
- Gaus, K., E. Chklovskaya, et al. (2005). "Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation." J Cell Biol **171**(1): 121-31.
- Girard, L., Z. Hanna, et al. (1996). "Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis." Genes Dev **10**(15): 1930-44.
- Glittenberg, M., C. Pitsouli, et al. (2006). "Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis." EMBO J **25**(20): 4697-706.
- Goode, S., M. Melnick, et al. (1996). "The neurogenic genes egghead and brainiac define a novel signaling pathway essential for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis." Development **122**(12): 3863-79.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, et al. (2007). "Structural basis for autoinhibition of Notch." Nat Struct Mol Biol **14**(4): 295-300.
- Gridley, T. (2003). "Notch signaling and inherited disease syndromes." Hum Mol Genet **12 Spec No 1**: R9-13.
- Griffitts, J. S., S. M. Haslam, et al. (2005). "Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin." Science **307**(5711): 922-5.
- Griffitts, J. S., J. L. Whitacre, et al. (2001). "Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme." Science **293**(5531): 860-4.
- Haines, N. and K. D. Irvine (2003). "Glycosylation regulates Notch signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(10): 786-97.
- Hao, M., S. Mukherjee, et al. (2001). "Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13072-7.
- Harder, T. and K. Simons (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 534-42.
- Hartenstein, A. Y., A. Rugendorff, et al. (1992). "The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo." Development **116**(4): 1203-20.
- He, F., K. Saito, et al. (2009). "Structural and Functional Characterization of the NHR1 Domain of the *Drosophila* Neuralized E3 Ligase in the Notch Signaling Pathway." J Mol Biol.

- Heitzler, P., M. Bourouis, et al. (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**(1): 161-71.
- Heitzler, P. and P. Simpson (1991). "The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*." Cell **64**(6): 1083-92.
- Henderson, S. T., D. Gao, et al. (1994). "lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*." Development **120**(10): 2913-24.
- Henrique, D., E. Hirsinger, et al. (1997). "Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina." Curr Biol **7**(9): 661-70.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1986). "The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **33**: 19-56, 301.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1992). "The ubiquitin system for protein degradation." Annu Rev Biochem **61**: 761-807.
- Heuss, S. F., D. Ndiaye-Lobry, et al. (2008). "The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(32): 11212-7.
- Hicke, L., H. L. Schubert, et al. (2005). "Ubiquitin-binding domains." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 610-21.
- Huppert, S. S., T. L. Jacobsen, et al. (1997). "Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis." Development **124**(17): 3283-91.
- Irvine, K. D. (1999). "Fringe, Notch, and making developmental boundaries." Curr Opin Genet Dev **9**(4): 434-41.
- Itoh, M., C. H. Kim, et al. (2003). "Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta." Dev Cell **4**(1): 67-82.
- Itoh, T., S. Koshiba, et al. (2001). "Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis." Science **291**(5506): 1047-51.
- Jacobsen, T. L., K. Brennan, et al. (1998). "Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*." Development **125**(22): 4531-40.
- Jaekel, R. and T. Klein (2006). "The *Drosophila* Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking." Dev Cell **11**(5): 655-69.
- Joutel, A., C. Corpechot, et al. (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." Nature **383**(6602): 707-10.
- Kahya, N., D. Scherfeld, et al. (2004). "Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy." J Struct Biol **147**(1): 77-89.
- Kaksonen, M., C. P. Toret, et al. (2005). "A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery." Cell **123**(2): 305-20.
- Katanaev, V. L., G. P. Solis, et al. (2008). "Reggie-1/flotillin-2 promotes secretion of the long-range signalling forms of Wingless and Hedgehog in *Drosophila*." EMBO J **27**(3): 509-21.
- Katic, I., L. G. Vallier, et al. (2005). "New positive regulators of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans* include the BRE-5/Brainiac glycosphingolipid biosynthesis enzyme." Genetics **171**(4): 1605-15.
- Klein, T. (2001). "Wing disc development in the fly: the early stages." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 470-5.

- Klein, T., K. Brennan, et al. (1997). "An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*." *Dev Biol* **189**(1): 123-34.
- Kohyama-Koganeya, A., T. Sasamura, et al. (2004). "Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors." *J Biol Chem* **279**(34): 35995-6002.
- Kolesnick, R. N. and M. Kronke (1998). "Regulation of ceramide production and apoptosis." *Annu Rev Physiol* **60**: 643-65.
- Kolter, T., R. L. Proia, et al. (2002). "Combinatorial ganglioside biosynthesis." *J Biol Chem* **277**(29): 25859-62.
- Komatsu, H., M. Y. Chao, et al. (2008). "OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development." *PLoS Biol* **6**(8): e196.
- Koo, B. K., K. J. Yoon, et al. (2005). "Mind bomb-2 is an E3 ligase for Notch ligand." *J Biol Chem* **280**(23): 22335-42.
- Koo, B. K., M. J. Yoon, et al. (2007). "An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development." *PLoS One* **2**(11): e1221.
- Kooh, P. J., R. G. Fehon, et al. (1993). "Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development." *Development* **117**(2): 493-507.
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." *Cell* **137**(2): 216-33.
- Koutelou, E., S. Sato, et al. (2008). "Neuralized-like 1 (Neurl1) targeted to the plasma membrane by N-myristoylation regulates the Notch ligand Jagged1." *J Biol Chem* **283**(7): 3846-53.
- Kurzchalia, T. V. and R. G. Parton (1996). "And still they are moving.... dynamic properties of caveolae." *FEBS Lett* **389**(1): 52-4.
- Ladi, E., J. T. Nichols, et al. (2005). "The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands." *J Cell Biol* **170**(6): 983-92.
- Lai, E. C., R. Bodner, et al. (2000). "The enhancer of split complex of *Drosophila* includes four Notch-regulated members of the bearded gene family." *Development* **127**(16): 3441-55.
- Lai, E. C., G. A. Deblandre, et al. (2001). "Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta." *Dev Cell* **1**(6): 783-94.
- Lai, E. C., F. Roegiers, et al. (2005). "The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta." *Development* **132**(10): 2319-32.
- Langhorst, M. F., A. Reuter, et al. (2008). "Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2." *Eur J Cell Biol* **87**(4): 211-26.
- Le Borgne, R., A. Bardin, et al. (2005). "The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling." *Development* **132**(8): 1751-62.
- Le Borgne, R., S. Remaud, et al. (2005). "Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*." *PLoS Biol* **3**(4): e96.
- Le Borgne, R. and F. Schweisguth (2003). "Notch signaling: endocytosis makes delta signal better." *Curr Biol* **13**(7): R273-5.
- Le Borgne, R. and F. Schweisguth (2003). "Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division." *Dev Cell* **5**(1): 139-48.

- Letourneur, F. and R. D. Klausner (1992). "A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains." Cell **69**(7): 1143-57.
- Leviten, M. W., E. C. Lai, et al. (1997). "The Drosophila gene Bearded encodes a novel small protein and shares 3' UTR sequence motifs with multiple Enhancer of split complex genes." Development **124**(20): 4039-51.
- Li, K., Y. Li, et al. (2008). "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3." J Biol Chem **283**(12): 8046-54.
- Li, L., I. D. Krantz, et al. (1997). "Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1." Nat Genet **16**(3): 243-51.
- Li, Y. and N. E. Baker (2004). "The roles of cis-inactivation by Notch ligands and of neuralized during eye and bristle patterning in Drosophila." BMC Dev Biol **4**: 5.
- Lieber, T., S. Kidd, et al. (2002). "kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch." Genes Dev **16**(2): 209-21.
- Lingwood, D. and K. Simons "Lipid rafts as a membrane-organizing principle." Science **327**(5961): 46-50.
- Lowell, S., P. Jones, et al. (2000). "Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters." Curr Biol **10**(9): 491-500.
- Lowell, S. and F. M. Watt (2001). "Delta regulates keratinocyte spreading and motility independently of differentiation." Mech Dev **107**(1-2): 133-40.
- Lu, H. and D. Bilder (2005). "Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila." Nat Cell Biol **7**(12): 1232-9.
- Malagarie-Cazenave, S., N. Andrieu-Abadie, et al. (2002). "Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF-alpha-induced cell death." Expert Rev Mol Med **4**(28): 1-15.
- Mayor, S. and F. R. Maxfield (1995). "Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment." Mol Biol Cell **6**(7): 929-44.
- Micchelli, C. A., E. J. Rulifson, et al. (1997). "The function and regulation of cut expression on the wing margin of Drosophila: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate." Development **124**(8): 1485-95.
- Miller, A. C., E. L. Lyons, et al. (2009). "cis-Inhibition of notch by endogenous delta biases the outcome of lateral inhibition." Curr Biol **19**(16): 1378-83.
- Molnar, C., A. Lopez-Varea, et al. (2006). "A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the Drosophila melanogaster wing." Genetics **174**(3): 1635-59.
- Morel, V., R. Le Borgne, et al. (2003). "Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression." Dev Genes Evol **213**(2): 65-72.
- Mucha, J., J. Domlatil, et al. (2004). "The Drosophila melanogaster homologue of the human histo-blood group Pk gene encodes a glycolipid-modifying alpha1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase." Biochem J **382**(Pt 1): 67-74.
- Nguyen, H. T., F. Voza, et al. (2007). "Drosophila mind bomb2 is required for maintaining muscle integrity and survival." J Cell Biol **179**(2): 219-27.
- Oda, T., A. G. Elkahlon, et al. (1997). "Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome." Nat Genet **16**(3): 235-42.
- Ossipova, O., J. Ezan, et al. (2009). "PAR-1 phosphorylates mind bomb to promote vertebrate neurogenesis." Dev Cell **17**(2): 222-33.

- Overstreet, E., E. Fitch, et al. (2004). "Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells." Development **131**(21): 5355-66.
- Parks, A. L., S. S. Huppert, et al. (1997). "The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*." Mech Dev **63**(1): 61-74.
- Parks, A. L., K. M. Klueg, et al. (2000). "Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway." Development **127**(7): 1373-85.
- Parks, A. L., F. R. Turner, et al. (1995). "Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during *Drosophila* eye development." Mech Dev **50**(2-3): 201-16.
- Pavlopoulos, E., C. Pitsouli, et al. (2001). "neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis." Dev Cell **1**(6): 807-16.
- Pizette, S., C. Rabouille, et al. (2009). "Glycosphingolipids control the extracellular gradient of the *Drosophila* EGFR ligand Gurken." Development **136**(4): 551-61.
- Poodry, C. A. (1990). "shibire, a neurogenic mutant of *Drosophila*." Dev Biol **138**(2): 464-72.
- Puri, V., R. Watanabe, et al. (2001). "Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways." J Cell Biol **154**(3): 535-47.
- Qi, H., M. D. Rand, et al. (1999). "Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian." Science **283**(5398): 91-4.
- Rampal, R., K. B. Luther, et al. (2007). "Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation." Curr Mol Med **7**(4): 427-45.
- Rauskolb, C., T. Correia, et al. (1999). "Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the *Drosophila* wing." Nature **401**(6752): 476-80.
- Rietveld, A., S. Neutz, et al. (1999). "Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains." J Biol Chem **274**(17): 12049-54.
- Roegiers, F. and Y. N. Jan (2004). "Asymmetric cell division." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 195-205.
- Romer, W., L. Berland, et al. (2007). "Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells." Nature **450**(7170): 670-5.
- Ropke, A., A. Kujat, et al. (2003). "Identification of 36 novel Jagged1 (JAG1) mutations in patients with Alagille syndrome." Hum Mutat **21**(1): 100.
- Sakamoto, K., O. Ohara, et al. (2002). "Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification." Dev Biol **241**(2): 313-26.
- Sato, T., T. S. Diehl, et al. (2007). "Active gamma-secretase complexes contain only one of each component." J Biol Chem **282**(47): 33985-93.
- Seugnet, L., P. Simpson, et al. (1997). "Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis." Dev Biol **192**(2): 585-98.
- Shih, S. C., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis." Nat Cell Biol **4**(5): 389-93.

- Sillence, D. J. (2007). "New insights into glycosphingolipid functions--storage, lipid rafts, and translocators." Int Rev Cytol **262**: 151-89.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Skwarek, L. C., M. K. Garroni, et al. (2007). "Neutralized contains a phosphoinositide-binding motif required downstream of ubiquitination for delta endocytosis and notch signaling." Dev Cell **13**(6): 783-95.
- Smith, D. C., J. M. Lord, et al. (2004). "Glycosphingolipids as toxin receptors." Semin Cell Dev Biol **15**(4): 397-408.
- Song, R., B. K. Koo, et al. (2006). "Neutralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind bomb-1." J Biol Chem **281**(47): 36391-400.
- Stanley, P. (2007). "Regulation of Notch signaling by glycosylation." Curr Opin Struct Biol **17**(5): 530-5.
- Sun, X. and S. Artavanis-Tsakonas (1996). "The intracellular deletions of Delta and Serrate define dominant negative forms of the Drosophila Notch ligands." Development **122**(8): 2465-74.
- Sun, Y., M. Kaksonen, et al. (2005). "Interaction of Sla2p's ANTH domain with PtdIns(4,5)P2 is important for actin-dependent endocytic internalization." Mol Biol Cell **16**(2): 717-30.
- Takeuchi, T., Y. Adachi, et al. (2005). "Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma." Am J Pathol **166**(6): 1817-26.
- Terrell, J., S. Shih, et al. (1998). "A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor." Mol Cell **1**(2): 193-202.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." EMBO J **19**(1): 94-102.
- Tian, X., D. Hansen, et al. (2004). "Epsin potentiates Notch pathway activity in Drosophila and C. elegans." Development **131**(23): 5807-15.
- Traub, L. M. (2009). "Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(9): 583-96.
- Vaccari, T., H. Lu, et al. (2008). "Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster." J Cell Biol **180**(4): 755-62.
- van der Blik, A. M. and E. M. Meyerowitz (1991). "Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic." Nature **351**(6325): 411-4.
- Vartiainen, M. K. and L. M. Machesky (2004). "The WASP-Arp2/3 pathway: genetic insights." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 174-81.
- Vodovar, N. and F. Schweisguth (2008). "Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy?" J Biol **7**(2): 7.
- Wang, W. and G. Struhl (2004). "Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch." Development **131**(21): 5367-80.
- Weng, A. P. and J. C. Aster (2004). "Multiple niches for Notch in cancer: context is everything." Curr Opin Genet Dev **14**(1): 48-54.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, et al. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." Science **306**(5694): 269-71.
- Wu, J. and E. H. Bresnick (2007). "Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated." Trends Biochem Sci **32**(10): 477-85.

- Xu, A., N. Haines, et al. (2007). "In vitro reconstitution of the modulation of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe." J Biol Chem **282**(48): 35153-62.
- Xu, A., L. Lei, et al. (2005). "Regions of Drosophila Notch that contribute to ligand binding and the modulatory influence of Fringe." J Biol Chem **280**(34): 30158-65.
- Yamashita, T., R. Wada, et al. (1999). "A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9142-7.
- Yeh, E., M. Dermer, et al. (2001). "Neutralized functions as an E3 ubiquitin ligase during Drosophila development." Curr Biol **11**(21): 1675-9.
- Zhai, L., D. Chaturvedi, et al. (2004). "Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine." J Biol Chem **279**(32): 33220-7.
- Zhang, C., Q. Li, et al. (2007). "The characterization of zebrafish antimorphic mib alleles reveals that Mib and Mind bomb-2 (Mib2) function redundantly." Dev Biol **305**(1): 14-27.

Identification de nouveaux régulateurs du trafic et de l'activité signalisatrice des ligands du récepteur Notch chez la drosophile

Analyse du rôle des glycosphingolipides

Sophie Hamel

La voie de signalisation Notch est une voie de signalisation conservée et primordiale aussi bien pour le développement des métazoaires que la maintenance de leurs tissus adultes. L'ubiquitine ligase Mind bomb1 (*Mib1*) est nécessaire à l'activation du récepteur Notch et contrôle l'ubiquitination et l'endocytose des ligands DLS (Delta/Serrate/Lag-2) de Notch. Afin d'identifier de nouveaux régulateurs de la signalisation des ligands DSL chez la drosophile, j'ai réalisé un crible modificateur sur un phénotype d'aile induit par des différentes réduction d'activité *mib1*. Une collection de lignées GS (Gene Search), permettant l'expression ectopique des gènes adjacents à leur point d'insertion, a permis d'identifier deux interacteurs génétiques de *mib1* : $\alpha 4GT1$ et *Hsc70-4*. *Hsc70-4* est un régulateur de la dynamique du manteau de clathrin dont la fonction dans la signalisation Notch et l'endocytose des ligands DSL n'a pas encore été analysée. $\alpha 4GT1$ est une $\alpha 1,4$ -Nacétylgalactosaminyltransferase impliquée dans la voie de biosynthèse des glycosphingolipides (GSLs). L'obtention d'allèles mutants de cette enzyme a révélé qu'elle n'était pas essentielle à la signalisation Notch. En revanche, sa surexpression restaure le trafic des ligands DSL dans des contextes de pertes partielles d'activité ubiquitine ligase. Des analyses génétiques, biochimiques ont permis de montrer que cette fonction d' $\alpha 4GT1$ dans la signalisation Notch nécessite la synthèse d'un glycosphingolipide (GSL) particulier, N5, produit par $\alpha 4GT1$. L'identification d'un motif conservé d'interaction avec les GSLs dans le domaine Nterminal de Delta et Serrate suggère une interaction directe entre ces ligands et les GSLs.