



HAL
open science

Caractérisation du rôle non ciliaire de la Kinésine-2 dans l'établissement de l'axe droite/gauche chez *Drosophila melanogaster*

Nicolas Porquet

► **To cite this version:**

Nicolas Porquet. Caractérisation du rôle non ciliaire de la Kinésine-2 dans l'établissement de l'axe droite/gauche chez *Drosophila melanogaster*. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4112 . tel-01242717

HAL Id: tel-01242717

<https://theses.hal.science/tel-01242717>

Submitted on 14 Dec 2015

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

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

Université Nice Sophia Antipolis

Ecole doctorale Science Vie Santé

**Caractérisation du rôle non ciliaire de la
Kinésine-2 dans l'établissement de l'axe
droite/gauche chez *Drosophila melanogaster***

Présentée par Nicolas Porquet

Thèse de doctorat en Sciences de la vie

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Dirigée par Dr Stéphane Noselli

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 13 Décembre

Devant un jury composé de :

| | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| BLADER PATRICK | DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM | Rapporteur |
| COUDELIS JEAN-BAPTISTE | CHERCHEUR POST-DOCTORAL, UNS | Examineur |
| NOSELLI STEPHANE | DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS | Directeur de thèse |
| PERONNET FREDERIQUE | DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS | Rapporteuse |



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 3.0 non transposé.

Résumé de la thèse

Dans le règne animal, l'établissement correct de l'axe droite/gauche (D/G) est essentiel au développement, au positionnement et au bon fonctionnement des organes vitaux. Chez les vertébrés, les cils jouent un rôle important dans la phase tardive de la détermination D/G. En revanche, chez les invertébrés c'est le cytosquelette d'actine qui est requis pour l'établissement de l'axe D/G. En particulier, chez *Drosophila melanogaster*, l'orientation horaire (dextrale) des organes est déterminée par un gène unique codant la Myosine non conventionnelle de type ID (MyoID). Les mécanismes cellulaires impliqués dans la brisure de symétrie initiale et sa propagation à l'ensemble du tissu sont, chez la drosophile, encore mal connus. Afin d'identifier de nouveaux gènes interagissant avec *myoID*, nous avons entrepris un crible génétique modificateur en contexte sensibilisé pour *myoID*. Grâce à ce crible, plusieurs gènes interagissant génétiquement avec *myoID* ont pu être isolés parmi lesquels *klp64D*. Celui-ci code l'une des sous-unités motrices du complexe moteur hétérotrimérique Kinésine-2. La Kinésine-2 est constituée de deux sous-unités motrices distinctes Klp64D et Klp68D et d'une sous-unité adaptatrice Kap3. Nous montrons que *klp68D* interagit génétiquement avec *myoID* lors de la mise en place de l'axe D/G. Ceci suggère donc un rôle de l'ensemble du complexe hétérotrimérique Kinésine-2 dans l'asymétrie D/G. Chez les vertébrés, la Kinésine-2 participe à l'assemblage des cils impliqués dans la détermination D/G lors de la gastrulation. Or, nos résultats démontrent que, chez la drosophile, les cils ne sont pas requis dans la détermination D/G. L'inactivation des gènes codant chaque sous-unité de la Kinésine-2 indique que ce complexe est requis dans la voie dextrale dépendant de MyoID. L'utilisation d'un système inductible thermosensible révèle que MyoID et la Kinésine-2 sont requis de manière synchrone lors de la détermination D/G. En outre, nous mettons en évidence le rôle important joué par la Kinésine-2 dans la rotation horaire du génitalia et l'enroulement dextral de l'intestin postérieur adulte (*hindgut*). Nous montrons également que la Kinésine-2 est requise dans l'organisateur D/G de l'*hindgut* adulte pour l'orientation biaisée des cellules qui n'expriment pas MyoID. Or, de manière intéressante nos résultats suggèrent que l'activité de la Kinésine-2 n'est pas requise dans le sous-ensemble de cellules qui exprime MyoID. De plus, le rôle joué par la Kinésine-2 dans l'asymétrie D/G semble indépendant de la polarité apico-basale et des jonctions adhérentes. Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère que la Kinésine-2 pourrait jouer un rôle non ciliaire dans la phase de propagation de l'information directionnelle induite par MyoID. Ces résultats nous permettent ainsi pour la première fois d'envisager le rôle d'un moteur microtubulaire dans la détermination D/G chez les invertébrés. Nos résultats suggèrent enfin un lien évolutif fort entre la drosophile et les vertébrés dans la morphogenèse D/G.

Thesis Abstract

In nature most of the bilateria are left/right (L/R) asymmetric. In *Drosophila*, asymmetry is apparent in the directional looping of gut and terminalia. Dextral orientation of organs is controlled by the activity of a single gene *myosin ID* (*myoID*) whose mutation induces a fully inverted L/R axis. To date little is known of how the initial L/R cue induced by MyoID is propagated and maintained through the rest of the architecture of the L/R organizer. Here we present the identification of *kfp64D* and *kfp68D* as new *myoID* interacting genes. These genes encode the two motor sub-units of the *Drosophila* Kinesin-2 motor complex. Interestingly, this microtubule-based motor plays a ciliary function in vertebrate L/R morphogenesis. However, we show that in *Drosophila* cilia are not involved in L/R asymmetry. We demonstrate that Kinesin-2 acts during L/R determination in the dextral pathway. Furthermore Kinesin-2 is required for proper L/R patterning both of male genitalia and of adult hindgut. L/R activity of Kinesin-2 is restricted to cells that do not express MyoID suggesting a role for this motor in propagation of the L/R cue. Our findings show for the first time a non ciliary role for Kinesin-2 in L/R axis determination. Thus, these results shed light on an evolutionary conservation between *Drosophila* and vertebrate L/R determination.

À Ophélie

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier Stéphane Noselli pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ce qui m'a permis de réaliser mon travail de thèse dans un environnement scientifique de grande qualité.

Mes plus sincères remerciements vont également à Frédérique Peronnet et Patrick Blader, qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Il me faut ensuite remercier tout particulièrement Jean-Baptiste Coutelis, pour m'avoir formé et guidé tout au long de mon doctorat.

Le hasard a voulu, JB, que je sois ton premier étudiant en thèse et tu aies accepté de relever ce défi. Ta rigueur et ton exigence m'ont permis de toujours chercher à me dépasser et à repousser les limites. Merci enfin pour ta disponibilité et tes indéniables qualités de pédagogue, servies par de larges connaissances et ta soif d'en apprendre toujours plus.

Je tiens désormais à remercier les membres du groupe « asymétrie droite/gauche » : Charles, pour ses conseils avisés, ses corrections et relectures à chacune des étapes de mon parcours et Nicanor, pour ses suggestions techniques.

Un grand merci aussi aux membres de la "Noselli team": Christian, fidèle et sympathique occupant de la pièce à mouches, Solange, Raphaël, Patrick, Nadège, Geordie, Véronique, Caroline pour votre soutien.

Je n'oublierai pas non plus les membres des services communs pour leur écoute, leur aide et leur dévouement pour résoudre les petits soucis techniques ou administratifs qui ponctuent notre quotidien. Maëlle, Sébastien, Anthony, Laurent, Marc, Virginie, Martine, Gilles, Olivier: chacune des rencontres avec l'un d'entre vous fût très enrichissante.

Un clin d'œil particulier au sympathique groupe de la cantine des impôts, pour les conversations passionnantes qui animaient chaque pause déjeuner et leurs chaleureux encouragements.

Un grand merci à l'ensemble de la communauté des drosophilistes pour leurs conseils scientifiques et techniques et leurs précieux dons de lignées et de réactifs.

Une affectueuse pensée pour Jacques Huot, qui m'a transmis sa passion du métier et son enthousiasme tout en contribuant à ma formation scientifique au cours de mon deuxième cycle canadien.

Merci évidemment à la Fondation pour la Recherche Médicale et ses donateurs, pour avoir cru en mon projet et financé mes quatre années de thèse.

Un grand merci à Ophélie et à mes parents qui ont toujours cru en moi et sans qui je ne serais sans doute jamais parvenu jusqu'ici. Leur soutien permanent et leurs encouragements ont créé l'énergie positive indispensable à la réalisation de ce projet. Je suis infiniment reconnaissant envers Ophélie d'avoir été à mes côtés et de m'avoir épaulé à chaque étape de cette aventure...

Abréviations

| | |
|-----------|---|
| A/P | Antéro-Postérieur |
| AEL | After Egg Laying |
| AFP | Après Formation de la Pupa |
| AMPc | Adénosine MonoPhosphate cyclique |
| APC | Adenomatous Polyposis Coli |
| ARD | Armadillo Rich Domain |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ATP | Adénosine-5'-TriPhosphate |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| CamKII | Calmodulin-dependent kinase II |
| ChAT | Choline Acetyl Transferase |
| D/G | Droite/Gauche |
| D/V | Dorso/Ventral |
| EB1 | End Binding 1 |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GTP | Guanosine Triphosphate |
| HPZ | Hindgut Proliferation Zone |
| jpc | jour post coitum |
| JNKK | Jun N-terminale Kinase Kinase |
| kDa | kiloDalton |
| LRD | Left-Right Dynein |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MDCK | Madin-Darby Canine Kidney |
| N-term | N-terminal |
| PP | Polarité Planaire |
| PAK | p21-activated kinase |
| PDGF/VEGF | Platelet-derived growth factor/Vascular Endothelial Growth Factor |
| PH | Pleckstrin Homology |
| Pkd111 | Polycystic kidney disease 1 like 1 |
| Pkd2 | Polycystic kidney disease 2 |
| PML | Plaqué Mésodermique Latérale |
| RNP | RiboNucléoProtéine |
| VIH | Virus de l'Immunodéficience Humaine |
| VK | Vésicule de Kuppfer |

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| RESUME DE LA THESE | 3 |
| THESIS ABSTRACT..... | 4 |
| REMERCIEMENTS | 6 |
| ABREVIATIONS..... | 8 |
| TABLE DES MATIERES | 9 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 14 |
| PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION | 16 |
| CHAPITRE 1 : MECANISMES IMPLIQUES DANS L’ETABLISSEMENT DE L’AXE D/G DANS LE MONDE ANIMAL. | 17 |
| 1-PRINCIPES COMMUNS GOUVERNANT LA MISE EN PLACE DE L’AXE D/G..... | 17 |
| 2-MISE EN PLACE DE L’AXE D/G CHEZ LES DEUTEROSTOMES | 18 |
| 2.1. Les Vertébrés..... | 18 |
| 2.1.1. Cils et flux nodal dans le processus de latéralisation chez les vertébrés..... | 18 |
| 2.1.1.1 Mise en évidence du flux nodal et de son implication dans la détermination D/G..... | 18 |
| 2.1.1.2 Rotation des cils et génération du flux directionnel..... | 21 |
| 2.1.1.2.1 Structure chirale des cils | 21 |
| 2.1.1.2.2 Génération et détection du flux nodal | 21 |
| 2.1.1.2.3 Rôle du calcium dans l’asymétrie D/G | 24 |
| 2.1.1.3 Propagation de la brisure et expression génique asymétrique..... | 24 |
| 2.1.1.3.1 Expression asymétrique des gènes autour de l’organisateur D/G..... | 24 |
| 2.1.1.3.2 Expression du facteur de transcription <i>Pitx2</i> dans le mésoderme latéral gauche..... | 26 |
| 2.1.1.3.3 Morphogenèse asymétrique..... | 27 |
| 2.1.1.4 Limites du modèle ciliaire | 27 |
| 2.1.1.4.1 La contribution des cils dans la détermination D/G en question..... | 28 |
| 2.1.1.4.2 Détermination D/G en l’absence de cils..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2 Le modèle intracellulaire : traduire une chiralité cytoplasmique en une asymétrie multicellulaire..... | 30 |
| 2.1.2.1 Le modèle du flux ionique | 31 |
| 2.1.2.2 Le modèle de ségrégation des chromatides | 33 |
| 2.1.2.3 Le modèle de la polarité planaire..... | 34 |
| 2.1.2.3.1 Mise en place de la polarité planaire | 34 |
| 2.1.2.3.2 Lien entre polarité planaire et asymétrie D/G | 35 |
| 2.2 L'oursin | 37 |
| 3-ASYMETRIE D/G CHEZ LES PROTOSTOMES..... | 39 |
| 3.1 Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> | 39 |
| 3.1.1 Etapes précoces de la détermination de l'axe D/G chez <i>C. elegans</i> | 39 |
| 3.1.2 Morphogenèse asymétrique D/G..... | 40 |
| 3.1.3 Implication de la voie Notch..... | 41 |
| 3.1.4 La polarité planaire et la voie Wnt contrôlent-elles la détermination D/G chez <i>C. elegans</i> ? | 41 |
| 3.2 Les spiraliens | 42 |
| 3.3 <i>Drosophila melanogaster</i> | 44 |
| 3.3.1 Les marqueurs asymétriques D/G chez la drosophile..... | 44 |
| 3.3.1.1 L'intestin | 44 |
| 3.3.1.1.1 L'intestin embryonnaire | 44 |
| 3.3.1.1.2 L'intestin adulte..... | 46 |
| 3.3.1.2 Le génitalia | 47 |
| 3.3.1.3 Les testicules | 49 |
| 3.3.1.3 Asymétries fonctionnelles et morphologiques | 50 |
| 3.3.1.3.1 Le Cerveau | 50 |
| 3.3.1.3.2 Les Reins | 50 |
| 3.3.2 Mutants affectant l'asymétrie D/G sans inversion de l'axe | 50 |
| 3.3.2.1 Rôle de la voie de signalisation JNK dans la détermination D/G..... | 50 |
| 3.3.2.3 Fasciline 2 et les terpénoides | 51 |
| 3.3.2.2 Gènes impliqués dans l'établissement de l'axe D/G dans l'intestin embryonnaire..... | 51 |
| 3.3.2.4 Gènes impliqués dans la rotation directionnelle du génitalia..... | 52 |
| 3.3.3 Brisure de symétrie chez la drosophile | 53 |
| 3.3.3.1 Mise en évidence du rôle déterminant de MyoID dans l'asymétrie D/G | 53 |
| 3.3.3.1.1 MyoID et mutants <i>situs inversus</i> | 53 |
| 3.3.3.1.2 Expression de MyoID dans les primordia | 53 |
| 3.3.3.1.3 Structure et fonction cellulaire de MyoID dans la détermination D/G..... | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.3.2 Abd-B et l'activation transcriptionnelle précoce des déterminants D/G..... | 56 |
| 3.3.3.3 Rôle des jonctions adhérentes et de MyoIC en aval de MyoID | 57 |
| 3.3.4 Apoptose et rotation directionnelle du génitalia | 58 |
| 4-ASYMETRIE CEREBRALE | 58 |
| 4.1 Latéralisation structurale et fonctionnelle du cerveau | 58 |
| 4.2 Asymétrie D/G cérébrale chez le zebrafish | 59 |
| CHAPITRE 2 : LA KINESINE-2, UN MOTEUR AUX MULTIPLES FACETTES. | 61 |
| 1-STRUCTURE ET ETATS OLIGOMERIQUE DES SOUS-UNITES MOTRICES DE LA KINESINE-2..... | 61 |
| 1.1 Composition du complexe moteur hétérotrimérique..... | 61 |
| 1.2 Régulation et stabilisation de l'oligomérisation..... | 63 |
| 2-EVOLUTION ET CONSERVATION DE LA KINESINE-2..... | 63 |
| 3-MOTILITE ET EXECUTION DU MOUVEMENT | 65 |
| 4-FONCTIONS CELLULAIRES DE LA KINESINE-2 HETEROTRIMERIQUE. | 66 |
| 4.1 Fonctions ciliaires | 66 |
| 4.1.1 Transport intraflagellaire et ciliogenèse | 66 |
| 4.1.2 Rôle dans la morphogenèse et la viabilité des cellules photoréceptrices | 66 |
| 4.2 Fonctions non ciliaires | 67 |
| 4.2.1 Transport axonal et cytoplasmique d'organelles | 67 |
| 4.2.1.1 Dans les cellules neuronales | 67 |
| 4.2.1.2 Transport cytoplasmique de vésicules et d'organelles | 67 |
| 4.2.2 Transport intracellulaire du VIH | 68 |
| 4.2.3 Mitose et cytokinèse | 68 |
| 4.2.4 Transport des ARN..... | 68 |
| 4.2.5 Polarisation des cellules | 69 |
| 4.2.5.1 Polarité neuronale..... | 69 |
| 4.2.5.1 Polarité et migration cellulaire..... | 69 |
| 4.2.6 Adhésion cellule-cellule..... | 70 |
| 4.3 Fonctions ciliaires et non ciliaires de la Kinésine-2 au cours du développement. | 70 |
| 5-FONCTIONS DE LA KINESINE-2 HOMODIMERIQUE | 71 |
| 6-REGULATION DU TRANSPORT ET COOPERATION AVEC D'AUTRES MOTEURS..... | 72 |
| 6.1 Rôle de la sous-unité KAP dans la régulation du transport..... | 72 |
| 6.1.1 Structure et conformation de la sous-unité KAP..... | 72 |
| 6.1.2 Fonctions biologiques de KAP | 72 |
| 6.2 Coopération fonctionnelle entre la Kinésine-2 et d'autres moteurs. | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 7-MALADIES ASSOCIEES AUX MOTEURS KINESINE-2 | 73 |
| CONCLUSION | 75 |

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES **76**

| | |
|--|-----------|
| 1. REFERENCES DES LIGNEES UTILISEES DANS CETTE ETUDE. | 76 |
| 2. CRIBLE GENETIQUE | 77 |
| 3. PHENOTYPES ET MARQUEURS D/G | 77 |
| 3.1 PHENOTYPES DE ROTATION | 77 |
| 3.2 PHENOTYPES D'ENROULEMENT DE L' <i>HINDGUT</i> ADULTE. | 79 |
| 4. SYSTEME UAS/GAL4 ET RNA INTERFERENCE CHEZ LA DROSOPHILE..... | 79 |
| 5. DETERMINATION DE LA FENETRE TEMPORELLE D'ACTIVITE D'UNE PROTEINE..... | 81 |
| 6. IMMUNO-MARQUAGES ET ANALYSE D'IMAGES. | 82 |
| 6-1 DISSECTION ET MARQUAGE DE L' <i>HINDGUT</i> A 9 HEURES APRES FORMATION DE LA PUPE A 25°C | 82 |
| 6.2 DISSECTION ET MARQUAGE DE L' <i>HINDGUT</i> DES MOUCHES ADULTES. | 83 |
| 6.3 ANALYSE D'IMAGES PAR IMAGE J. | 84 |

TROISIEME PARTIE : RESULTATS **85**

| | |
|---|-----------|
| 1. PRESENTATION DU CRIBLE GENETIQUE MODIFICATEUR EN CONTEXTE SENSIBILISE POUR MYOID. | 85 |
| 2. LOST, UN NOUVEAU GENE INTERAGISSANT AVEC MYOID. | 86 |
| 3. LA KINESINE-2, UN NOUVEL ACTEUR DE LA VOIE DEXTRALE. | 88 |
| 3.1 <i>KLP64D</i> ET <i>KLP68D</i> INTERAGISSENT GENETIQUEMENT AVEC <i>MYOID</i> | 88 |
| 3.2 LA KINESINE-2, UN PARTENAIRE FONCTIONNEL DE MYOID | 90 |
| 3.2.1 Rôle de la Kinésine-2 dans la détermination dextrale. | 90 |
| 3.2.2 Fenêtre d'activité de Klp64D..... | 92 |
| 3.3 IMPLICATION DES CILS DANS L'ASYMETRIE D/G CHEZ LA DROSOPHILE. | 93 |
| 3.4 LA KINESINE-2 EST ESSENTIELLE A LA MISE EN PLACE DE L'AXE D/G DANS L'INTESTIN ADULTE. | 94 |
| 3.5 LA POLARITE APICO-BASALE DES CELLULES EPITHELIALES DE L' <i>HINDGUT</i> ADULTE NE DEPEND PAS DE L'ACTIVITE DE LA KINESINE-2. | 98 |
| 3.6 <i>DAPC1</i> N'INTERAGIT PAS GENETIQUEMENT AVEC <i>MYOID</i> | 104 |
| 3.7 CONCLUSION..... | 105 |

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE **106**

| | |
|--|----------------|
| 1. DETERMINANT SINISTRAL ET FONCTION DE MYOID DANS LA DETERMINATION D/G | 106 |
| 1.1 RECHERCHE DU DETERMINANT SINISTRAL ET STRATEGIE EXPERIMENTALE..... | 106 |
| 1.2 MODELES D’ETABLISSEMENT DE L’AXE D/G CHEZ LA DROSOPHILE..... | 107 |
| 1.3 FONCTION DE MYOID DANS LA BRISURE DE SYMETRIE : HYPOTHESES ET PERSPECTIVES..... | 109 |
| 1.3.1 Fonction de transport de MyoID et détermination D/G | 110 |
| 1.3.2 Fonction d’ancrage de MyoID et régulation des propriétés mécaniques de la membrane | 110 |
| 1.4 UNE LATERALISATION PAR ETAPES AU SEIN DE L’ORGANISATEUR D/G..... | 112 |
| 2. FONCTION DES MICROTUBULES ET DE LA KINESINE-2 DANS LA DETERMINATION D/G..... | 114 |
| 2.1 LES MICROTUBULES DANS L’ASYMETRIE D/G..... | 114 |
| 2.2 FONCTION CELLULAIRE DE LA KINESINE-2 DANS LA DETERMINATION D/G : NOUVELLES HYPOTHESES ET PERSPECTIVES | 116 |
| 2.2.1 Kinésine-2 et polarité planaire | 116 |
| 2.2.2 Kinésine-2 et polarité des microtubules | 117 |
| 3. LA KINESINE-2, UN LIEN EVOLUTIF ENTRE VERTEBRES ET DROSOPHILE ? | 118 |
| 4. MODELE INTRACELLULAIRE VS MODELE CILIAIRE : UN CONSENSUS EST-IL POSSIBLE ? | 120 |
| 4.1 UNE VISION SEQUENTIELLE DE LA DETERMINATION D/G | 120 |
| 4.2 MECANISMES D/G ET REDONDANCE | 121 |
| 4.3 L’ORGANISATEUR D/G A-T-IL EVOLUE FONCTIONNELLEMENT ?..... | 122 |
| CONCLUSION..... | 124 |
| BIBLIOGRAPHIE | 126 |
| ANNEXES 1 | 139 |

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1. Etapes de mise en place de l'axe D/G..... | 17 |
| Figure 2. Transport intraflagellaire bidirectionnel | 20 |
| Figure 3. Le flux nodal est généré par le mouvement rotatoire des cils du nœud..... | 22 |
| Figure 4. Inclinaison postérieure des cils du nœud | 23 |
| Figure 5. Implication de la signalisation calcique dans la détermination D/G. | 24 |
| Figure 6. Mise en place de l'axe D/G chez le poulet. | 26 |
| Figure 7. Le système <i>self-enhancement and lateral inhibition</i> | 27 |
| Figure 8. Modèle de courbure directionnelle du tube digestif | 30 |
| Figure 9. Modèle d'établissement de la polarité planaire dans l'aile de la drosophile | 35 |
| Figure 10. Comparaison des deux modèles d'établissement de l'axe D/G..... | 37 |
| Figure 11. Asymétrie D/G chez l'oursin | 38 |
| Figure 12. Evènements précoces de brisure de symétrie chez <i>C. elegans</i> | 39 |
| Figure 13. Asymétrie D/G dans l'intestin embryonnaire de la drosophile..... | 46 |
| Figure 14. Vue dorsale de l'intestin chez la drosophile adulte. | 47 |
| Figure 15. Cycle de développement du disque génital mâle..... | 49 |
| Figure 16. Etapes conduisant à la rotation directionnelle du génitalia..... | 54 |
| Tableau 1. Régionalisation de l'activité de MyoID. | 55 |
| Figure 17 Structure, assemblage et organisation des domaines des sous-unités de la Kinésine-2..... | 62 |
| Figure 18. Arbre phylogénétique des sous-unités de la Kinésine-2 | 64 |
| Figure 19. Transport des mélanosomes impliquant la Kinésine-2 hétérotrimérique. | 74 |
| Tableau 2. Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude..... | 76 |
| Tableau 3. Lignées recombinantes établies au cours de cette étude | 77 |

| | |
|---|-----|
| Figure 20. Rotation du génitalia mâle et détermination des phénotypes de rotation. | 79 |
| Figure 21. Présentation du système UAS/Gal4..... | 80 |
| Figure 22. Contrôle temporel du système UAS/Gal4 : utilisation du répresseur Gal80 | 82 |
| Tableau 4. Liste des anticorps utilisés dans cette étude | 84 |
| Figure 23. Identification de <i>lost</i> comme un nouveau gène interagissant avec <i>myoID</i> | 87 |
| Figure 24. Un crible génétique modificateur identifie <i>klp64D</i> comme un nouveau gène interagissant avec <i>myoID</i> | 88 |
| Figure 25. La kinésine-2 hétérotrimérique dans son ensemble est impliquée dans la détermination D/G..... | 89 |
| Tableau 5. Phénotypes de rotation du génitalia mâle associés à l’inactivation des gènes codant les sous-unités de la Kinésine-2. | 92 |
| Figure 26. Fenêtre d’activité de Klp64D et MyoID. | 93 |
| Tableau 6. Phénotypes de rotation du génitalia mâle associés à l’inactivation des gènes codant des protéines impliquées dans la ciliogenèse..... | 94 |
| Figure 27. La Kinesin-2 est requise pour la rotation directionnelle de l’ <i>hindgut</i> adulte..... | 96 |
| Figure 28. Chiralité des cellules MID- de l’ <i>hindgut</i> adulte..... | 98 |
| Tableau 7. Phénotypes de rotation du génitalia mâle associés à l’inactivation des principaux gènes impliqués dans la polarité apico-basale. | 100 |
| Figure 29. Localisation des jonctions adhérentes et polarité apico-basales des cellules épithéliales de l’ <i>hindgut</i> adulte au stade larvaire 3 | 102 |
| Figure 30. Localisation des jonctions adhérentes et du domaine baso-latéral des cellules épithéliales de l’ <i>hindgut</i> adulte à 9h AFP..... | 103 |
| Figure 31. <i>dapc1</i> et <i>dapc2</i> n’interagissent pas avec <i>myoID</i> | 104 |
| Figure 32. Modélisation de la mise en place de l’axe D/G chez la drosophile | 114 |

Première partie: Introduction

Dans le règne animal, l'établissement correct de l'axe droite/gauche (D/G) est essentiel au développement, au positionnement et au bon fonctionnement des organes vitaux. En effet, même si la majorité des bilatéraux présentent un aspect extérieur symétrique, ils possèdent aussi une asymétrie interne. Celle-ci peut se caractériser par l'asymétrie anatomique intrinsèque d'un organe pair (les poumons chez l'homme), le positionnement latéralisé de certains organes (le cœur ou la rate chez l'homme) et/ou l'enroulement orienté de structures tubulaires comme l'intestin. L'axe D/G s'établit de manière à être perpendiculaire aux deux autres axes embryonnaires, antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV). La mise en place de cette asymétrie D/G est finement régulée au niveau moléculaire et cellulaire.

Un programme génétique détermine donc, au cours de l'embryogenèse, la conformation particulière de l'organisme par rapport à l'axe D/G. Cette conformation, est appelée *situs solitus* [1]. Cependant, des défauts d'établissement de l'axe D/G peuvent apparaître. Ils sont assez rares chez l'homme (1/15000). On distingue le *situs inversus* (inversion totale de l'ensemble des organes) d'un *situs ambiguus* (inversion d'un nombre limité d'organes ou position médiane d'un organe normalement latéralisé). Si le *situs inversus* est, la plupart du temps, asymptomatique sur le plan clinique, le *situs ambiguus* peut être associé à des malformations graves qui mènent, pour les formes les plus sévères, à des avortements spontanés. Parmi les défauts affectant l'axe D/G et induisant un *situs ambiguus* on distingue l'hétérotaxie (la perte de concordance entre les organes internes), l'inversion d'un organe unique comme le *dextrocardia* (l'inversion de la position et de la morphologie du cœur) et l'isomérisme (symétrie de l'axe D/G entraînant une duplication ou la perte de certains organes comme la rate) [2]. A ce jour seuls deux gènes *situs inversus* ont été identifiés moléculairement : le gène *inversin (inv)* [3] chez la souris et la *myosine non conventionnelle de type ID (myoID)* [4] chez la drosophile.

Cette introduction vise à décrire, comparer et discuter les différents mécanismes et modèles gouvernant l'établissement de l'axe D/G dans le règne animal. Nous ferons ensuite l'état des lieux des connaissances sur le moteur microtubulaire Kinésine-2. Les résultats relatifs à son implication dans la mise en place de l'axe D/G chez *Drosophila melanogaster* seront présentés et discutés dans la suite de cette thèse.

Chapitre 1 : Mécanismes impliqués dans l'établissement de l'axe D/G dans le monde animal.

1-Principes communs gouvernant la mise en place de l'axe D/G.

La mise en place d'un axe D/G peut se décomposer en trois étapes distinctes (Figure 1) [1, 2, 5]. La première étape correspond à l'évènement de **brisure de symétrie**. Cet évènement se caractérise par la génération du premier biais asymétrique de manière localisée dans l'organisme et son orientation par rapport aux axes antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV). L'étape suivante consiste en une **propagation** au reste de l'organisme de ce signal D/G initial qui met en jeu des mécanismes d'amplification du biais D/G. Ceci peut se traduire par une expression différentielle et stable de certains gènes du côté gauche et du côté droit de la ligne médiane. Enfin, cette asymétrie D/G est **convertie** en une morphogenèse orientée. Les expressions géniques latéralisées agissent sur le comportement des cellules (comme leur taux de migration [6]) ce qui aboutit à une position asymétrique du cœur et des organes. Cette dernière étape est particulièrement conservée parmi les vertébrés [2].

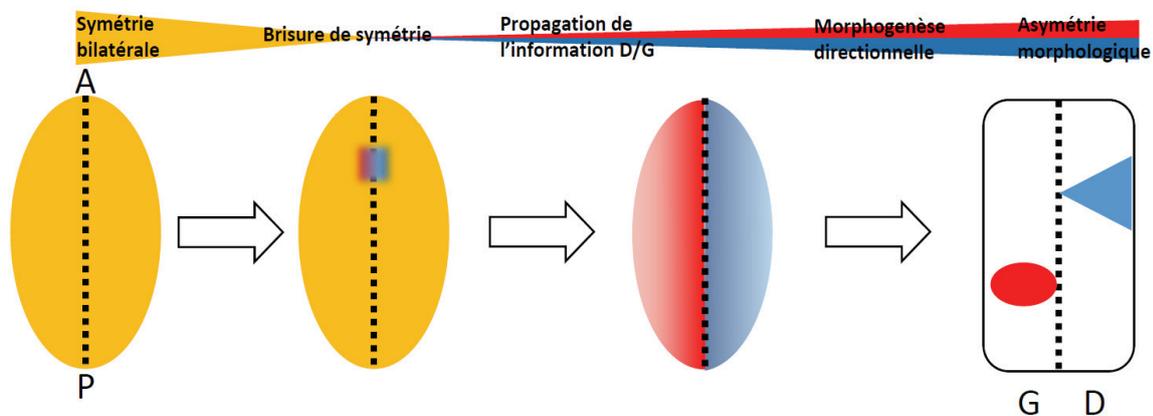


Figure 1. Etapes de mise en place de l'axe D/G

La mise en place de l'axe Droite/Gauche peut se décomposer en 3 étapes : (1) La brisure de symétrie induisant un premier biais Droite/Gauche et son orientation par rapport aux deux axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Ce biais doit ensuite être (2) propagé à l'ensemble des tissus pour permettre la conversion du programme génique D/G en une morphogenèse asymétrique (3).

La détermination de l'axe D/G repose donc sur une succession d'évènements convertissant une asymétrie à l'échelle moléculaire en une asymétrie au niveau cellulaire puis

tissulaire [7]. Pour expliquer la génération de ce biais D/G initial, Brown et Wolpert ont postulé la présence d'une molécule asymétrique latéralisée ou d'une structure macromoléculaire qu'ils ont représentées par la lettre «F»[7]. Cet élément « F » doit être chirale (non superposable à son image dans un miroir) et pouvoir s'orienter en fonction des axes AP et DV. Sa chiralité la rend alors capable de déterminer l'axe D/G. L'identification de cet élément chiral à l'origine de la brisure de symétrie fait encore l'objet de débats. Il reste également à déterminer à quel moment agit cet élément au cours de l'embryogenèse et comment sont conservés les mécanismes de brisure dans les différents phyla [2].

L'établissement des axes D/G dans le monde animal est contrôlé par des mécanismes génétiques et épigénétiques robustes dont certains présentent un haut degré de conservation évolutive alors que d'autres semblent spécifiques à une espèce donnée [8]. Sur la base des connaissances relatives aux mécanismes de brisure de symétrie il a été proposé de différencier les Deutérostomes des Protostomes [9].

2-Mise en place de l'axe D/G chez les Deutérostomes

2.1. Les Vertébrés

2.1.1. *Cils et flux nodal dans le processus de latéralisation chez les vertébrés.*

Le modèle prédominant pour expliquer l'évènement de brisure de symétrie chez certains vertébrés se fonde sur le mouvement des cils qui génère un flux de liquide extra-embryonnaire au niveau d'une structure transitoire se formant au cours de la gastrulation [8]. Cette structure située sur la ligne médiane est appelée nœud chez la souris, vésicule de Kupffer (*VK*) chez le zebrafish, nœud de Hensen chez le poulet et le plafond du gastrocoele chez le xénope [8]. Le nœud embryonnaire (comme les structures équivalentes chez les autres espèces) permet d'orienter l'axe D/G par rapport aux axes A/P et D/V ; il peut donc être considéré comme un organisateur D/G chez ces organismes.

2.1.1.1 Mise en évidence du flux nodal et de son implication dans la détermination D/G.

Les premiers indices de l'implication des cils dans la détermination D/G chez l'homme proviennent d'observations sur des patients atteints du syndrome décrit par Kartagener en 1935. Ces personnes présentent en effet une infertilité masculine (immobilité des spermatozoïdes) et des problèmes respiratoires (cils défectueux au niveau des voies respiratoires). En outre, 50% des personnes atteintes présentent un *situs inversus* [10].

Le rôle des cils dans la détermination D/G a ensuite été mis en évidence expérimentalement grâce à des études réalisées chez la souris sur les moteurs moléculaires appartenant à la superfamille des kinésines (KIFs). En particulier, il a été montré que l'invalidation de chaque sous-unité motrice KIF3A et KIF3B de la Kinésine-2 chez la souris engendre un situs aléatoire et une létalité embryonnaire [11-13]. La moitié des souris présente ainsi une inversion de la courbure cardiaque alors que l'autre moitié présente une courbure normale. Afin de déterminer la position de KIF3A et KIF3B dans la cascade de signalisation impliquée dans la détermination D/G, l'expression du gène *Lefty-2* a été observée [11-13]. Ce gène est, chez l'embryon sauvage, exclusivement exprimé du côté gauche de manière précoce. Chez les souris mutantes pour *Kif3a* ou *Kif3b*, l'expression de *Lefty-2* est absente ou apparaît de chaque côté de l'embryon. Ces données suggèrent par conséquent que KIF3A et KIF3B agissent en amont de *Lefty-2* dans la cascade de signalisation D/G. En outre les cellules de la face ventrale du nœud de l'embryon sauvage présentent des monocils. Or le nœud des embryons mutants pour KIF3A ou KIF3B est dépourvu de cils ou présente des cils très courts retrouvés uniquement de manière sporadique [14]. En outre les analyses immunocytochimiques réalisées sur l'embryon sauvage ont montré que KIF3A et KIF3B sont localisées dans les monocils des cellules de la face ventrale du nœud [12, 13]. Par conséquent l'ensemble de ces données couplé aux études réalisées sur le transport intraflagellaire chez les eucaryotes inférieurs [15] indiquent que KIF3A et KIF3B sont requises pour le transport intraciliaire de complexes protéiques indispensables à la ciliogenèse (Figure 2) [14].

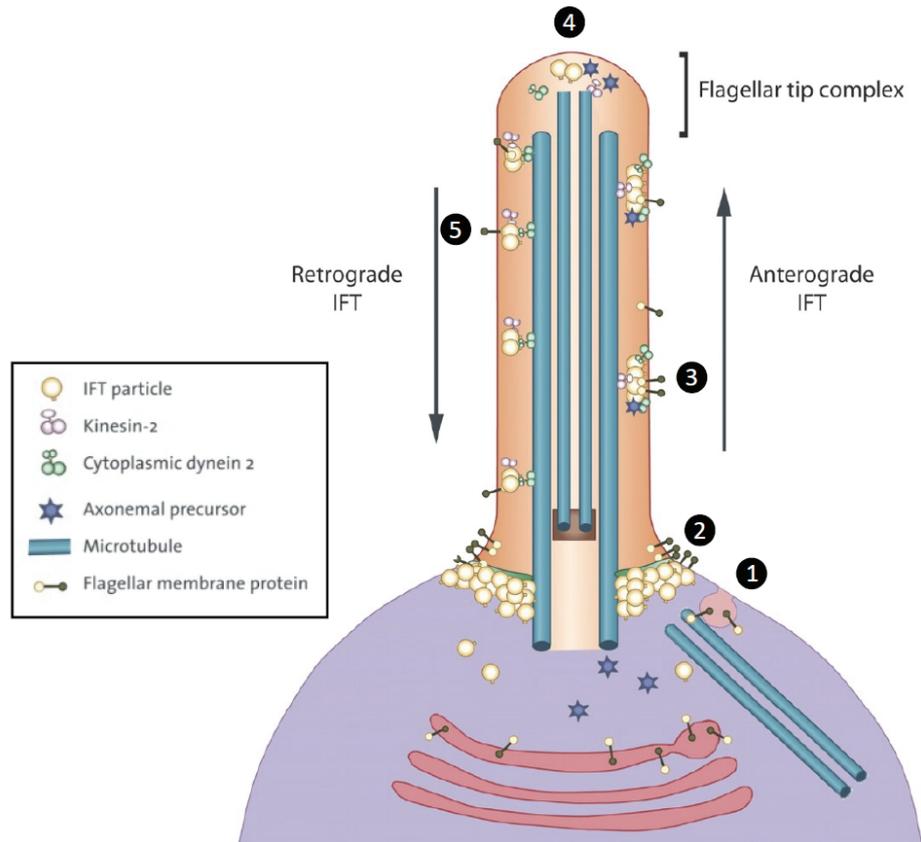


Figure 2. Transport intraflagellaire bidirectionnel

Les particules du transport intraflagellaire et les cargos associés requis pour l'assemblage et la maintenance du flagelle s'accumulent autour de la région du corps basal (2) (base du flagelle) où ils s'assemblent entre eux pour ensuite passer par la zone de transition (pore flagellaire) et accéder à l'intérieur du flagelle. Les particules sont transportées par un transport antérograde jusqu'à la pointe du flagelle (site d'assemblage de l'axonème). Ce transport est assuré par la Kinésine-2 (3). Les protéines de la membrane flagellaire qui sont incluses dans les vésicules qui ont bourgeonné à partir de l'appareil de Golgi et qui ont ensuite fusionné avec la membrane plasmique adjacente au corps basal (1), sont emmenées par les particules du transport intraflagellaire pour permettre leur passage par la zone de transition puis leur transport au sein de la membrane flagellaire. Ces protéines membranaires vont ensuite être déplacées au sein de la bicouche lipidique du cil par les composants du transport intraflagellaire. A la pointe du flagelle, le cargo antérograde est déchargé (4), le moteur Kinésine-2 est inactivé pour le transport vers le cytoplasme. C'est la dynéine cytoplasmique qui est activée et qui assure le transport rétrograde vers le cytoplasme (5). (Crédit : [16]).

Ces cils présentent un mouvement rotatoire rapide (600 tpm) dans le sens horaire (lorsque l'on regarde à partir de la position ventrale), ce qui génère un flux nodal dirigé vers la gauche [8, 17]. L'absence de cils au niveau du nœud (due à une invalidation de KIF3A ou KIF3B) de même que la paralysie de ces cils (due à une mutation dans le gène *lrd*) induisent une absence de flux nodal [13, 18, 19]. En outre l'application d'un flux nodal artificiel est capable de restaurer le développement D/G normal chez l'embryon de souris mutant pour *lrd* [20]. Le gène *lrd* code la chaîne lourde de la dynéine axonémale [19]. Par conséquent le mouvement de rotation des mono-cils du nœud embryonnaire induisant le flux nodal joue un rôle important dans la mise en place de l'axe D/G chez la souris.

Des flux de liquide extra-embryonnaire au niveau du nœud ont également été observés chez le xénope [21], le lapin [22] et le zébrafish [23, 24]. Ainsi, chez le xénope une augmentation de la viscosité du fluide dans le gastrocoele supprime le flux et aboutit à un situs aléatoire. Le même phénotype est obtenu chez le zébrafish lorsqu'on élimine le flux directionnel au niveau de l'organisateur D/G. Ceci a été montré en utilisant des morpholinos antisens dirigés contre certains gènes impliqués dans l'assemblage et/ou la motilité des cils [10].

2.1.1.2 Rotation des cils et génération du flux directionnel.

2.1.1.2.1 Structure chirale des cils

Les cils sont des organelles cellulaires multifonctionnelles dont l'ossature est constituée par des microtubules. Ils émettent des projections depuis la surface apicale de la plupart des cellules [25]. Les cils motiles qui effectuent un mouvement de rotation au niveau du nœud ou des structures équivalentes sont constitués de 9 doublets de microtubules périphériques et d'un doublet central qui peut être absent chez certaines espèces [26]. Le zébrafish ou le médaka présentent des cils motiles qui effectuent un mouvement rotatoire conduisant à l'établissement de l'axe D/G [22-24]. Les cils de la vésicule de Kupffer du médaka sont dépourvus de doublet central [22]. En revanche, chez le zébrafish, les cils présentent le doublet central [24]. Chez la souris, il a été récemment montré que les cils du nœud présentent également un doublet central [27]. Par conséquent le mouvement rotatoire du cil n'est pas lié à l'absence ou à la présence du doublet central. Ces doublets périphériques sont orientés par l'accrochage des bras de la dynéine LRD et sont positionnés dans le sens des aiguilles d'une montre (lorsque le cil est vu en coupe depuis son extrémité). Cette orientation des doublets microtubulaires rend la structure du cil chirale [28]. En outre, l'ancrage du cil au niveau de la cellule est assuré par le corps basal qui est également une structure chirale. En effet, il est formé de neuf triplets orientés de microtubules. Par conséquent, il a été proposé que dans le cas des mammifères, cette structure monociliaire chirale remplissait les critères associés à l'élément « F » [29].

2.1.1.2.2 Génération et détection du flux nodal

La plupart des cils motiles ou des flagelles présente uniquement un mouvement de va-et-vient [14]. Comme nous l'avons vu précédemment, les cils du nœud sont capables de tourner dans le sens des aiguilles d'une montre. Ce mouvement est généré par la dynéine axonémale. La rotation concertée de ces cils au niveau du nœud génère un flux de liquide

extra-embryonnaire de la droite vers la gauche à la surface du nœud (Figure 3) [12, 13, 18]. Ce flux appelé flux nodal joue un rôle important dans la détermination D/G.

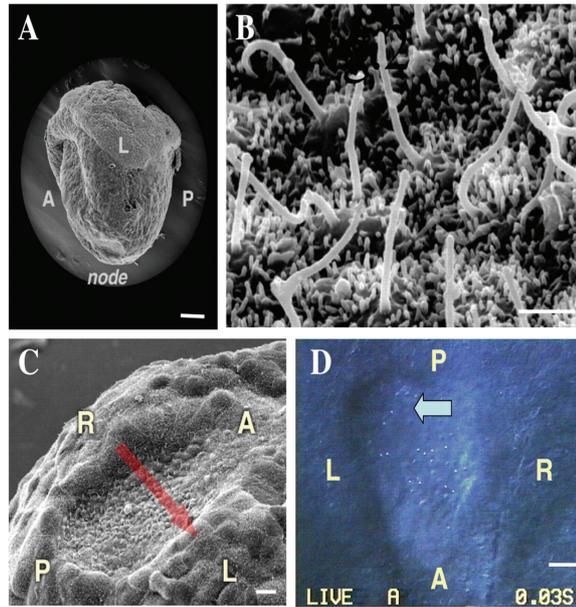


Figure 3. Le flux nodal est généré par le mouvement rotatoire des cils du nœud.

(A) Vue latérale d'un embryon de souris à 8 jours post coitum (jpc) Barre d'échelle: 100 μm . (B) Monocils du nœud de l'embryon murin à fort grossissement Barre d'échelle: 1 μm . (C) Vue ventrale de la cavité du nœud. Les axes Antéro-Postérieur (A/P) et Droite/Gauche ou *Right/Left* (R/L) sont représentés. La flèche rouge représente la direction du flux nodal. Barre d'échelle: 10 μm . (D) Vue ventrale de la cavité du nœud montrant des billes fluorescentes qui permettent de visualiser la direction du flux vers le côté gauche du nœud. Barre d'échelle: 10 μm . Crédit : [30]

Chez la souris, le corps basal situé à la base de chaque cil est localisé sur le côté postérieur des cellules du nœud [22, 29]. Cette polarisation du corps basal est responsable de l'inclinaison postérieure du cil que permet la forme convexe de la surface des cellules du nœud. En raison de cette inclinaison postérieure de l'axe de rotation des cils (formant un angle de 40° par rapport à la surface du nœud) le mouvement du cil vers le côté gauche est plus efficace pour créer le flux directionnel que le mouvement du cil vers le côté droit (Figure 4) [8]. En d'autres termes, le mouvement de fouet du cil vers la gauche est favorisé alors que le retour vers la droite est freiné. En outre, des études récentes ont quantifié le nombre de cils requis pour établir l'asymétrie D/G chez la souris [31]. Les auteurs ont observé que les embryons avec zéro ou un seul cil présentent un *situs* aléatoire. En revanche pour les embryons possédant deux cils ou plus, l'axe D/G se met en place normalement [31]. Le flux est alors réduit mais suffisant pour permettre l'établissement correct de l'axe D/G.

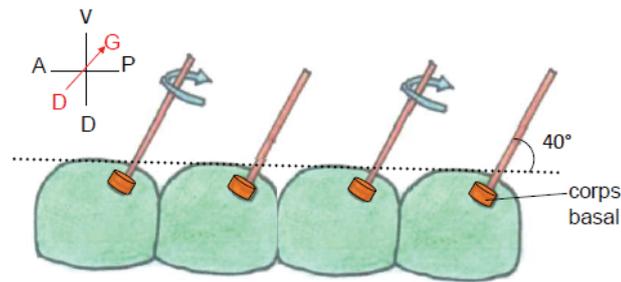


Figure 4. Inclinaison postérieure des cils du nœud

Les embryons de xénope comme les embryons de zébrafish et de médaka présentent des organisateurs D/G ciliés similaires au nœud de la souris. Ainsi, que ce soit au niveau de la vésicule de Kupffer (zébrafish/médaka) ou du plafond du gastrocoele (xénope) la motilité des cils génère un flux unidirectionnel de liquide extra-embryonnaire.

Le mécanisme précis par lequel ce flux induit la brisure de symétrie reste à déterminer. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer comment ce flux directionnel est détecté au niveau de l'embryon puis traduit en une information directionnelle [26] :

- La première hypothèse (appelée « hypothèse des morphogènes ») est basée sur le transport, par le flux nodal, d'un morphogène vers le côté gauche du nœud. Ainsi cette molécule qui se dégrade rapidement devient enrichie du côté gauche. Cette plus forte concentration du côté gauche est détectée conduisant à un signal asymétrique [13]. Les données expérimentales de même que les modélisations informatiques suggèrent que ce genre d'enrichissement est plausible pour les molécules dont le poids moléculaire est compris entre 15 et 50 kDa, cependant la nature du morphogène et les récepteurs activés restent inconnus [22, 32]
- La deuxième hypothèse (appelée « hypothèse des deux cils ») se base sur la présence de deux types de cils : motiles et non motiles au niveau du nœud des souris. Les cils non motiles sensoriels sont situés au niveau de la région périphérique du nœud et détectent le flux exclusivement sur le côté gauche du nœud. Ils sont plus particulièrement spécialisés dans la détection de la force mécanique générée par ce flux [33]. Par conséquent cette hypothèse rajoute un niveau de complexité supplémentaire concernant la fonction D/G des cils du nœud. Ce modèle sépare en effet le processus du flux nodal en deux phases : la génération « mécanique » du flux contrôlée par une première catégorie de cils motiles et la détection de ce flux par un

autre type de cils non motiles [26]. La détection du flux par les cils non motiles implique le canal perméable aux ions Ca^{2+} , Pkd2 [33].

2.1.1.2.3 Rôle du calcium dans l'asymétrie D/G

Le calcium joue donc un rôle important dans l'évènement de brisure de symétrie et plus particulièrement dans la détection du flux nodal. La détection du calcium intracellulaire a ainsi révélé une asymétrie concernant le signal calcique entre les deux côtés de l'organisateur D/G des vertébrés [8]. De plus Pkd2 (pour *polycystic kidney disease 2*) et Pkd111 (pour *polycystic kidney disease 1 like 1*) qui forment des canaux calciques sont requis chez la souris pour l'expression asymétrique de Nodal dans la plaque mésodermique latérale (PML) [34, 35]. De même, au niveau de la vésicule de Kupffer, la Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CamKII) agit lors de la détermination D/G chez le zébrafish. Ces observations indiquent donc qu'un influx calcique est impliqué dans la détermination D/G et renforcent l'hypothèse « des deux cils ». Cependant, le rôle précis de l'influx calcique dans l'asymétrie D/G reste encore inconnu.

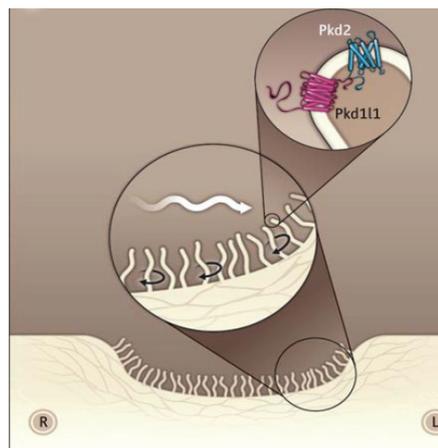


Figure 5. Implication de la signalisation calcique dans la détermination D/G.

Représentation schématique de la coupe transversale d'un nœud montrant les complexes Pkd111-Pkd2 localisés au niveau des cils non motiles des cellules de la couronne. Ces cils détectent le flux dirigé vers la gauche du nœud. Crédit : [36]

2.1.1.3 Propagation de la brisure et expression génique asymétrique.

2.1.1.3.1 Expression asymétrique des gènes autour de l'organisateur D/G.

Le flux généré par les cils chez certains vertébrés de même que la migration directionnelle des cellules embryonnaires observées chez le poulet (Figure 6) induisent une expression asymétrique de gènes spécifiques autour de l'organisateur D/G.

Chez la souris, le gène codant Cer12, un antagoniste de Nodal, est exprimé de façon asymétrique autour du nœud embryonnaire. Nodal est une protéine sécrétée qui appartient à la

famille du TGF- β . *Cerl2* est donc capable d'inhiber l'activité de Nodal préférentiellement du côté droit ; de plus il est requis pour l'établissement correct de l'axe D/G [37]. Le signal asymétrique généré au niveau du nœud est ensuite transmis aux tissus environnants. Nodal est ainsi sécrété par la face basolatérale des cellules situées autour du nœud (cellules périnodales). Nodal pourrait ensuite emprunter une route interne aux tissus embryonnaires via les cellules du mésoderme para-axial (mésoderme à l'origine des somites) jusqu'à la plaque mésodermique latérale (PML) gauche. C'est au niveau de la PML gauche que Nodal active l'expression du gène *nodal* [8, 38, 39]. Un signal calcique est détecté au niveau de la marge gauche du nœud, ce qui suggère que des signaux calciques pourraient également être transmis depuis le nœud jusqu'à la PML [33].

Chez le xénope, le gène *Coco*, orthologue de *Cerl2*, semble être impliqué dans la réponse précoce. Il est exprimé de manière asymétrique autour de l'organisateur et joue le même rôle que *Cerl2* [40]. Par ailleurs, l'expression de *nodal* pourrait être régulée de manière épigénétique par l'activité de l'histone désacétylase lors des stades précoces du développement (voir aussi la section 2.1.2.1) [41].

Chez le zébrafish et le médaka, un autre orthologue de *Cerl2*, *Charon* est exprimé de manière asymétrique au niveau de la vésicule de Kupffer et est requis pour la détermination D/G [8].

Chez le poulet, l'établissement de l'asymétrie autour du nœud semble impliquer :

- Du côté droit du nœud, l'Activin B appartenant à la famille du TGF β qui induit l'expression de *Bmp4* qui à son tour réprime l'expression de *Shh* (Figure 6) [8].
- A l'inverse, du côté gauche du nœud où l'Activin B est réprimée, *Shh* est induit ce qui réprime l'expression *Bmp4* et induit l'expression d'un orthologue de Nodal, *cNR-1*. Ceci permet l'établissement de l'expression asymétrique de certains gènes autour du nœud et la transmission d'un signal à la PML gauche où l'expression de *cNR-1* est activée [8].

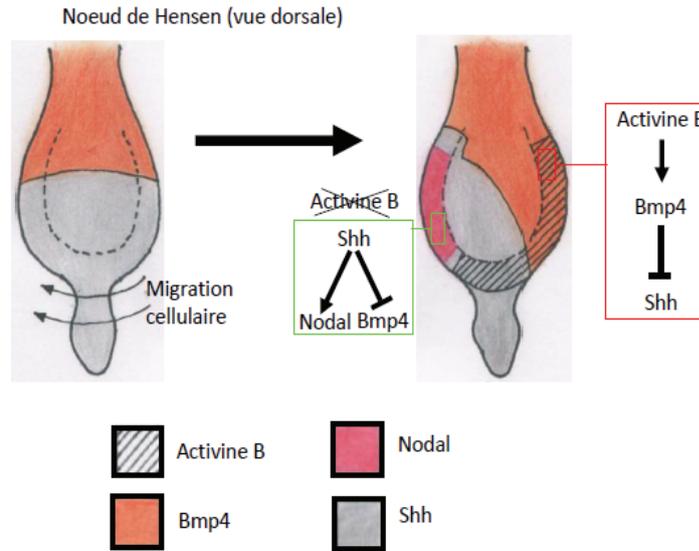


Figure 6. Mise en place de l'axe D/G chez le poulet.

Dans l'embryon de poulet, les cellules migrent précocement de la droite vers la gauche autour du nœud de Hensen. Puis la mise en place de l'axe D/G implique du côté droit du nœud l'activine B qui induit l'expression de Bmp4 qui à son tour réprime Shh. Du côté gauche, l'activine B est réprimée, Shh est donc induit ce qui réprime l'expression de Bmp4 et active l'expression de l'orthologue de Nodal, cNR-1.

2.1.1.3.2 Expression du facteur de transcription *Pitx2* dans le mésoderme latéral gauche.

A la suite de l'étape de brisure de symétrie au niveau de l'organisateur D/G, une expression asymétrique des gènes est observée au niveau de la PML gauche [8].

Chez la souris, *Nodal*, *Lefty2* et *Pitx2* sont ainsi exprimés dans la PML exclusivement du côté gauche. *Lefty2* code une protéine sécrétée qui, comme Nodal, appartient à la famille du TGF- β . *Pitx2* code un facteur de transcription à homéo-domaines de type bicoid. Une combinaison de boucles de rétrocontrôle positives et négatives constituent ainsi le système SELI (pour *self-enhancement and lateral inhibition*) capable d'amplifier une légère différence entre le côté gauche et le côté droit du nœud en une différence robuste dans la PML. La boucle Nodal/lefty1,2/*Pitx2* se met en place de la manière suivante (Figure 7) [42]:

1. Nodal constitue le déterminant du côté gauche et Lefty exerce un rétrocontrôle négatif sur Nodal. Lefty1 et Lefty2 vont donc permettre de confiner spatialement et temporellement l'expression de *Nodal* du côté gauche.
2. Nodal active sa propre expression via une boucle d'autorégulation positive qui implique le Nodal-responsive enhancer de *Nodal* ce qui conduit à l'expansion du domaine d'expression de *Nodal*.

3. Nodal induit simultanément l'expression de *Lefty1* et *Lefty2*

Ce système semble être bien conservé chez les vertébrés [42, 43] même si d'autres gènes peuvent, chez certaines espèces, être aussi exprimés de manière asymétrique dans la PML (exposé en détail dans [8]).

L'expression asymétrique de Nodal dans la PML gauche induit l'expression de *Pitx2*.

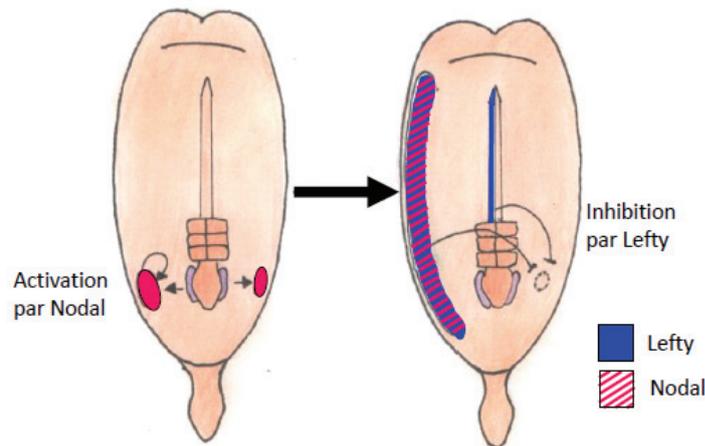


Figure 7. Le système *self-enhancement and lateral inhibition*.

Le signal provenant du nœud atteint les deux côtés du mésoderme latéral. Cependant, en raison du flux asymétrique (ou d'autres mécanismes d'asymétrie), le signal du côté gauche est plus fort que celui du côté droit. L'expression de Nodal est alors induite et amplifiée par Nodal lui-même au niveau de la plaque mésodermique latérale gauche. De plus les inhibiteurs de Nodal, *Lefty 1* et *Lefty 2* sont induits par Nodal et diffusent du côté droit où ils inhibent l'expression de Nodal.

2.1.1.3.3 Morphogenèse asymétrique.

L'expression de *pitx2* du côté gauche induit la morphogenèse asymétrique de la plupart des organes viscéraux. Les mécanismes cellulaires responsables de l'organogenèse asymétrique chez les vertébrés restent encore mal connus. Néanmoins, certains évènements morphogénétiques tels que la courbure du tube cardiaque ou la rotation fœtale chez la souris sont indépendants de *Pitx2* [44].

2.1.1.4 Limites du modèle ciliaire

De nombreuses études lient les phénotypes D/G à des défauts affectant les cils. En outre, il semble admis que les cils contribuent à la détermination D/G chez certaines espèces comme la souris et le xénope [2] (section 2.1.1.4.1) (Figure 10) . M Levin défend l'idée selon laquelle les cils ne constituent pas le seul mécanisme pour établir l'asymétrie D/G chez les autres vertébrés (sections 2.1.1.4.2 et 2.1.2). Cette théorie est renforcée par de nombreuses

données cohérentes avec l'existence de mécanismes alternatifs précoces impliqués dans la détermination D/G (section 2.1.2) [2].

2.1.1.4.1 La contribution des cils dans la détermination D/G en question

Seul un nombre limité d'études ont fonctionnellement testé le rôle du mouvement ciliaire *per se* (en l'absence de perturbations génétiques qui affectent aussi les fonctions intracellulaires) dans la détermination D/G [45]. Des changements directs de viscosité dans l'espace intraciliaire de même que l'inversion/sauvetage du flux nodal suggèrent que le mouvement ciliaire peut directement contrôler la détermination D/G. Par ailleurs ces expériences de modulation de la viscosité ont été réalisées à la fois chez la souris et le xénope [2, 20, 21]. Dans les deux cas l'altération du flux entraîne un situs aléatoire mais avec une pénétrance bien inférieure chez le xénope par rapport à la souris. Ces différences de pénétrance pourraient donc révéler des différences dans les contributions relatives des cils dans la détermination D/G chez ces deux espèces.

Dans la majorité des études l'implication des cils dans l'asymétrie D/G a été montrée par des délétions génétiques/mutations de protéines qui possèdent également des fonctions non ciliaires [2]. Par conséquent, selon Vandenberg et Levin, ces études ne permettent pas de faire la distinction entre la fonction ciliaire et une fonction non ciliaire comme le transport intracellulaire ou la ségrégation des chromatides. Ces trois fonctions nécessitent en effet des protéines impliquées dans l'assemblage du cytosquelette, dans le transport intracellulaire et la polarité planaire. Vandenberg et Levin proposent ainsi que les altérations affectant des protéines avec des rôles pléiotropiques à la fois dans le transport intracellulaire et la structure/fonction des cils, pourraient induire, de manière indépendante, à la fois des phénotypes D/G et des défauts affectant la fonction ciliaire. Plusieurs études allant dans ce sens ont ainsi montré qu'il existe des mutants pour lesquels les phénotypes D/G et le mouvement des cils peuvent être dissociés [45]. C'est par exemple le cas lors de l'invalidation du gène ciliaire *foxj1b* chez le zébrafish [46]. La perte de ce gène spécifiquement dans les cellules qui contribuent à la formation de la vésicule de Kupffer n'a pas d'effet sur la détermination D/G. En revanche l'invalidation de ce gène dans toutes les cellules induit un situs aléatoire. Une autre étude, également réalisée chez le zébrafish portant sur des mutations du gène *seahorse* montre que l'on peut séparer génétiquement les défauts affectant les cils et les problèmes de latéralité [47]. D'autres études résultant de cribles génétiques chez le zébrafish ont également montré une faible corrélation entre la défectuosité des cils au niveau de la vésicule de Kupffer et les phénotypes D/G (voir les études portant sur les mutants *locke*

et *garbus* [48]). Même chez le modèle murin le lien de cause à effet entre mouvement ciliaire et asymétrie D/G, est affaibli par certaines données récentes. Ainsi l'invalidation des gènes *Inturned* [49] et *TMEM216* [50] induit des ciliopathies sans affecter la mise en place de l'axe D/G.

Par conséquent le modèle *ciliaire* ne permet pas d'expliquer les nombreux exemples de mutations induisant des cils anormaux ou absents sans conséquence sur la détermination D/G. Ces exemples limitent également la portée des études examinant le lien causal entre des mutations affectant des gènes ciliaires et les phénotypes D/G. Ces données remettent en cause le modèle *ciliaire* comme évènement initiateur unique de l'asymétrie. En revanche, les cils pourraient jouer un rôle important d'amplification de l'asymétrie chez certaines espèces.

2.1.1.4.2 Détermination D/G en l'absence de cils

Chez certains vertébrés comme le poulet ou le porc, la brisure de symétrie ne semble pas impliquer les cils [51]. Chez le poulet c'est la migration asymétrique des cellules autour de l'organisateur qui contrôle la détermination D/G (Figure 6). Ces cellules migrent de la droite vers la gauche (sens antihoraire) autour du nœud de Hensen aboutissant à l'expression asymétrique de gènes autour de l'organisateur [8]. Ce mécanisme reposant sur une migration directionnelle des cellules est spécifique à certains organismes.

La courbure de l'intestin du poulet (Figure 8) dépend dans un premier temps d'asymétries D/G au sein de l'architecture cellulaire du mésentère dorsal (structure qui connecte l'intestin en développement à la paroi de l'abdomen) [8, 52]. Ces asymétries proviennent de la condensation différentielle des cellules et de la présence d'épithélia différents entre le côté droit et le côté gauche du mésentère dorsal. En outre les cellules de l'épithélium recouvrant présentent des asymétries D/G, au niveau de leur morphologie. Ces asymétries sont sous le contrôle de *pitx2*. L'étape suivante correspond à la morphogenèse de la courbure de l'intestin. Cette morphogenèse dépend des forces homogènes et isotropes générées par la croissance différentielle entre le tube digestif et le feuillet mésentérique dorsal [53].

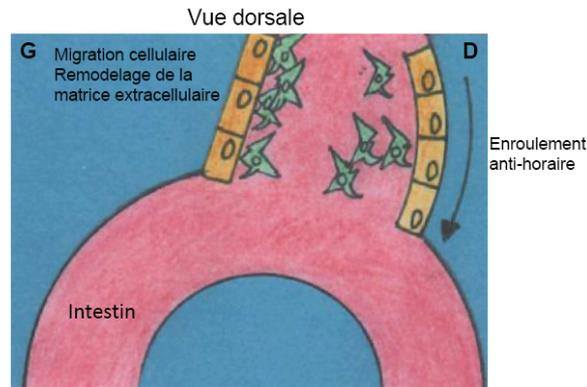


Figure 8. Modèle de courbure directionnelle du tube digestif

L'inclinaison du tube digestif est à l'origine de l'orientation biaisée de la rotation de l'intestin.

2.1.2 Le modèle intracellulaire : traduire une chiralité cytoplasmique en une asymétrie multicellulaire.

Les neurites en culture [54] comme les bactéries [55] présentent un comportement asymétrique. En outre, des travaux récents ont montré que certaines cellules, de manière individuelle, sont capables de modifier la configuration de leur cytosquelette afin d'adopter une conformation chirale. En particulier, les cellules non ciliées HL60 présentent en culture un biais D/G [56]. 88% de ces cellules leucémiques promyélocitaires émettent des pseudopodes vers la gauche de la ligne connectant le noyau et le centrosome. Lorsque l'on altère respectivement Par6, la dynéine et la GSK3 β , ces cellules sont capables de reproduire tous les défauts d'asymétrie D/G (isomérisme, hétérotaxie, et situs inversus) également observés après manipulation de l'axe D/G chez l'embryon [56].

Danilchick et col. ont rapporté récemment que l'œuf du xénope présente une chiralité invariante du cytosquelette d'actine qui pourrait être héritée maternellement. Cette chiralité du cytosquelette dépend de l'orientation polarisée des fibres d'actine préexistantes. De plus l'intégrité du cortex d'actomyosine est cruciale pour la mise en place des asymétries D/G tardives (comme la latéralisation des organes internes) [57]. Enfin, chez la souris, le sens de rotation foetale (rotation qui conduit les embryons de la position lordotique à la latéralité, vers le 9^{ème} jour embryonnaire) dépend de l'organisation des blastomères au stade 8 cellules [58]. Par conséquent ceci suggère qu'une partie de l'asymétrie chez la souris pourrait être déterminée avant la formation du nœud.

L'ensemble de ces études suggère donc que la plupart des cellules sont capables individuellement de présenter un biais D/G sans avoir recours à une structure multicellulaire

comme le nœud. Le fait que des asymétries précoces se mettent en place bien avant l'implication des cils et du flux nodal a conduit Vandenberg et Levin à proposer un modèle alternatif appelé *modèle intracellulaire* (Figure 10) [2]. Ce dernier diffère du *modèle ciliaire* car il propose :

- Que la génération de l'axe D/G repose sur la chiralité du cytosquelette et l'orientation de structures cytoplasmiques.
- Que les premières étapes de la mise en place de l'axe D/G ont lieu très précocement (bien avant l'apparition des cils) chez la plupart des organismes lors des premiers clivages cellulaires.
- Qu'à l'exception de la souris, les composants de cette voie intracellulaire sont largement conservés.

Le modèle intracellulaire (Figure 10) peut se décliner en trois sous-modèles : le modèle du *flux ionique* [59] la modèle de *ségrégation des chromatides* [60] et le modèle impliquant la *polarité planaire* [2, 61].

2.1.2.1 Le modèle du flux ionique

L'implication des pompes ioniques dans la mise en place de l'axe D/G a été mise en évidence en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques et des pertes de fonctions chez l'embryon de xénope et de poulet [2]. Le modèle du flux ionique propose ainsi que des structures chirales existantes au niveau du cytosquelette des cellules embryonnaires (c'est-à-dire le centre organisateur des microtubules et les fibres d'actine) sont orientées par rapport aux axes A/P et D/V lors du premier clivage embryonnaire [2]. Ce cytosquelette chiral est ensuite à l'origine de la distribution asymétrique de certaines protéines comme les canaux K^+ et les pompes à proton [62].

Les mécanismes dépendant des flux ioniques qui contrôlent précocement la détermination D/G sont bien documentés chez le xénope. Chez ce dernier, plusieurs gènes présentent des patrons d'expression génique asymétriques pendant les premiers stades de développement embryonnaire [63, 64]. A partir du stade embryonnaire deux cellules, l'ARNm et la protéine ATPase H^+/K^+ sont localisés de manière asymétrique [65]. Ainsi, quelques heures après fertilisation, la quantité d'ATPase H^+/K^+ (ARNm et protéine) est ainsi plus importante dans une des deux cellules. Les mécanismes responsables de cette distribution asymétrique sont mal connus mais impliquent probablement un transport unidirectionnel par un moteur moléculaire le long du cytosquelette. De plus la chiralité du cytosquelette lui-même (qui repose sur le positionnement asymétrique des extrémités + et -) pourrait jouer un rôle

dans le mouvement de la protéine motrice dans une direction particulière [8]. La disposition asymétrique selon l'axe D/G de ces transporteurs d'ions induit des différences de pH et de voltage transmembranaire marquées entre le côté gauche et le côté droit de l'embryon [66, 67]. En outre ces gradients bioélectriques conduiraient à la distribution asymétrique de petites molécules chargées comme le neurotransmetteur sérotonine chez le xénope (au stade embryonnaire 32 cellules). L'inhibition pharmacologique des récepteurs de la sérotonine R3 et R4 et la microinjection de constructions ARNm perte et gain de fonction de ces récepteurs induit une hétérotaxie. Cette molécule est capable de passer du côté gauche au côté droit dans l'embryon précoce grâce aux jonctions communicantes [59, 68]. La sérotonine s'accumule alors du côté droit de l'embryon. Carneiro et col. montrent que lors des stades précoces, l'histone désacétylase HDAC et Mad3 (dont l'activité dépend de la sérotonine) sont importants du côté droit de l'embryon pour réguler l'expression de *Xnr-1* (homologue de Nodal chez le xénope) [41]. Les auteurs suggèrent que du côté droit de l'embryon, la sérotonine se lie à Mad3 qui à son tour pourrait permettre le recrutement de l'histone désacétylase au niveau d'une région intronique de *Xnr-1* induisant une diminution du niveau d'acétylation des histones H3 et H4 de la région intronique. De manière intéressante, cette étude montre comment la sérotonine s'accumule du côté droit et réprime de manière épigénétique l'expression de *Xnr-1*. D'autres molécules comme PKC- γ et la syndecan-2 phosphorylée présentent également une distribution asymétrique dans l'embryon [63]. Par ailleurs, chez le poulet, le sens antihoraire de migration des cellules autour du nœud de Hensen est déterminé par une ATPase H⁺/K⁺ (Figure 6) [8].

L'implication de la sérotonine, des jonctions communicantes, des composants du cytosquelette (dont les protéines motrices) et des transporteurs ioniques (pompes à protons et canaux potassiques) dans la mise en place de l'axe D/G a été mis en évidence chez d'autres espèces. Ces composants impliqués dans le modèle ionique sont aussi retrouvés, entre autres, chez *C. elegans*, l'oursin, *Ciona* [2] et les plathelminthes [69]. Chez le poulet, l'ARNm de l'ATPase H⁺/K⁺ est localisé de manière asymétrique au niveau du nœud de Hensen et contrôle l'expression asymétrique du gène *Sonic Hedgehog* [65].

Cependant le rôle précoce de la sérotonine, des jonctions communicantes et de l'ATPase H⁺/K⁺ a été remis en question par plusieurs travaux récents [2]. Ces études montrent en effet que la sérotonine, les connexines et l'ATPase H⁺/K⁺ ont des rôles tardifs dans la détermination D/G. Par conséquent ces données peuvent être interprétées de deux manières :

- soit la sérotonine, les connexines et l'ATPase H^+/K^+ sont impliquées dans le modèle ciliaire
- soit les phénotypes ciliaires sont des conséquences indirectes d'événements précoces et ainsi coïncident sans être la cause des défauts d'asymétrie [2].

2.1.2.2 Le modèle de ségrégation des chromatides

Le deuxième modèle, proposé par Klar [60, 70, 71], est le *modèle de ségrégation des chromatides*. Ce modèle propose qu'au stade embryonnaire 1 cellule, les deux chromatides présentent une empreinte génomique différente et se ségrègent de manière différente (l'une vers la gauche et l'autre vers la droite) lors de la première division cellulaire [60, 70]. Chacune détient ainsi des informations permettant la distinction entre le côté gauche et le côté droit. Le mécanisme précis permettant aux deux premiers blastomères de s'orienter par rapport aux axes D/V et A/P est encore inconnu, cependant ce processus semble dépendre de la Left-Right Dynein (LRD) [72]. Cette protéine exerce également un rôle ciliaire lors de la détermination D/G chez la souris (voir section 2.1.1.1).

Comme le modèle *ciliaire* et le modèle du *flux ionique*, le modèle de *ségrégation des chromatides* s'appuie sur le fait que la mise en place des axes A/P et D/V (vraisemblablement au moment de la fécondation) précède l'établissement de l'axe D/G. Le processus permettant à l'axe D/G de s'orienter par rapport aux axes A/P et D/V est inconnu mais pourrait impliquer la polarité planaire [2] (voir aussi la section 2.1.2.3). Par ailleurs, le modèle de *ségrégation des chromatides* propose que l'empreinte génomique différente, portée par les chromatides influence l'expression de gènes spécifiques d'un seul côté de la ligne médiane. Ces gènes encore inconnus à ce jour permettraient ainsi de définir l'axe D/G [2]. La ségrégation différentielle des chromatides de même que la ségrégation différentielle cellule mère-cellule fille des ARNm et des protéines sont suffisantes pour maintenir l'asymétrie chez la levure [73, 74] et jouent également un rôle dans d'autres cellules eucaryotes et certains embryons [2]. En outre, le modèle de *ségrégation des chromatides* a été conforté par une étude récente réalisée chez *C. elegans* [75]. La ségrégation des chromatides marquée par des états chromatinien différents pourrait ainsi constituer un mécanisme épigénétique conservé permettant d'induire une asymétrie bilatérale dans le système nerveux aussi bien chez le nématode [75] que chez les mammifères [72, 76].

2.1.2.3 Le modèle de la polarité planaire

2.1.2.3.1 Mise en place de la polarité planaire

La polarité planaire (PP) est un mécanisme intracellulaire hautement conservé permettant l'orientation uniforme, dans le plan de l'épithélium, de certaines structures au sein de l'œil (ommatidies) ou de l'aile (soies de l'aile) de la drosophile mais aussi au niveau du rein des mammifères ou des poumons. L'étude de la polarité épithéliale dans l'aile de la drosophile a permis de mieux comprendre l'établissement de la PP [77]. Les cellules de l'aile de la drosophile possèdent en effet une soie épidermique en position apicale. Cette soie est positionnée dans la partie distale de la cellule et orientée selon l'axe proximo-distal de l'épithélium de l'aile.

Il a été établi que la PP se met en place perpendiculairement à la polarité apico-basale en trois étapes (Figure 9) [77] :

1. Dans un premier temps, quelques heures avant la formation de la soie, les protéines de la PP sont recrutées au cortex membranaire en position apico-latérale (au niveau de la zonula adherens des cellules). La distribution de ces protéines est initialement homogène mais une redistribution proximo-distale s'opère rapidement. Certaines protéines comme Strabismus (Stbm) sont confinées du côté proximal de la cellule alors que d'autres comme Frizzled (Fz) sont regroupées du côté distal [78] .
2. Dans un deuxième temps Stbm recrute Prickled du côté proximal de la cellule ce qui antagonise Dishevelled (Dsh) et confine le complexe Dsh-Fz du côté distal de la cellule [61]. Dans le même temps des interactions entre le domaine extracellulaire de Stbm et Fz au niveau des membranes adjacentes proximales et distales des cellules environnantes vont stabiliser cette configuration polarisée parmi un nombre limité de cellules.
3. Cette distribution asymétrique des protéines de polarité planaire pourrait se transmettre de proche en proche à partir d'un nombre restreint de cellules organisatrices [61].

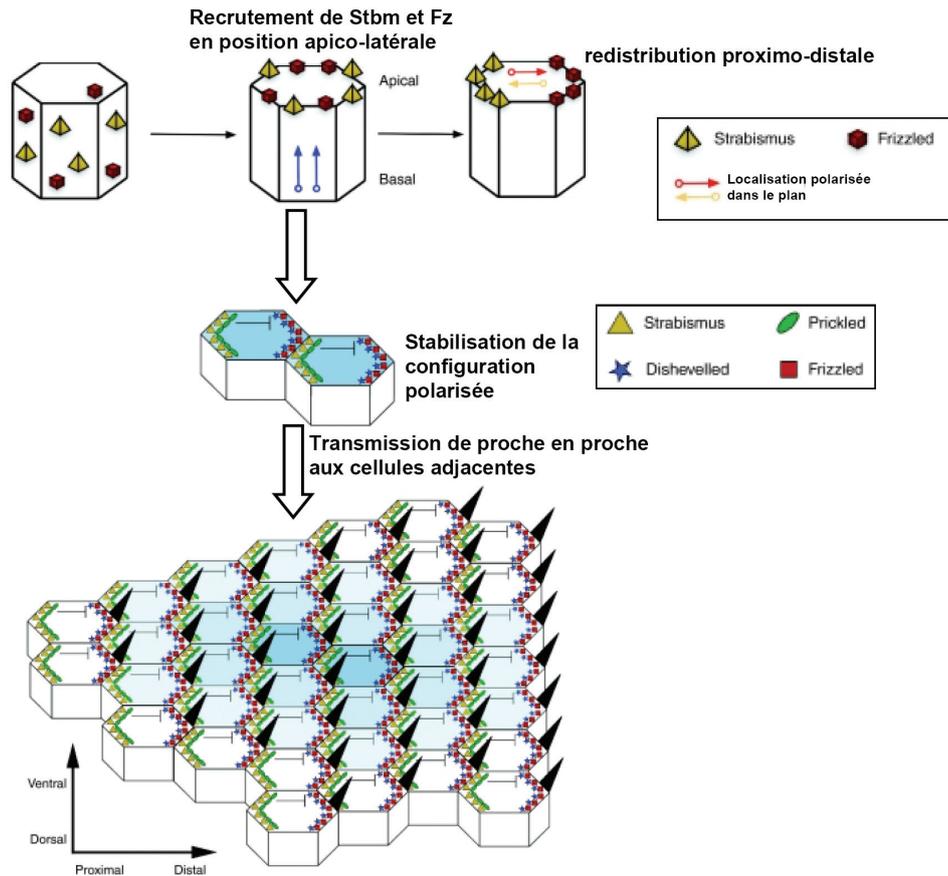


Figure 9. Modèle d'établissement de la polarité planaire dans l'aile de la drosophile (modifié de [61])

2.1.2.3.2 Lien entre polarité planaire et asymétrie D/G

Le modèle de la PP proposé par Aw et Levin se base sur deux hypothèses indépendantes mais compatibles [61]. D'une part, l'asymétrie D/G pourrait être une forme de PP qui transmet l'information D/G à l'ensemble de l'embryon. D'autre part le signal capable d'orienter la transmission coordonnée de l'information D/G planaire émanerait de l'intérieur d'une seule cellule ou d'un petit groupe de cellules. Dans ces cellules, ce sont les microtubules qui établiraient l'orientation initiale de cette polarité. Selon Aw et Levin, la PP et l'asymétrie D/G ont en commun trois grandes phases :

- L'orientation d'un premier signal de polarité qui s'oriente lui-même par rapport aux deux autres axes A/P et D/V.
- Ce signal est ensuite transmis et amplifié par la fonction asymétrique d'une protéine au niveau d'un tissu ou d'un organisme (comme par exemple la signalisation nodal du côté gauche de l'embryon).

- Enfin les asymétries moléculaires sont interprétées par chaque tissu pour la mise en place de la morphogenèse asymétrique [61].

Des analogies existent entre les phénotypes des animaux qui expriment des mutations perte de fonction pour les gènes impliqués dans la PP et les animaux dont les gènes de détermination de l'axe D/G sont affectés [61]. Aw et Levin proposent que l'asymétrie D/G comme la polarité planaire pourraient utiliser le cytosquelette comme un vecteur pour la localisation subcellulaire polarisée de molécules clefs.

De manière intéressante, des données récentes [79] mettent en évidence la capacité des protéines de polarité planaire à contrôler l'orientation des cils au niveau du nœud. Ainsi la localisation postérieure du corps basal au niveau des cellules du nœud (cf. section 2.1.1.2) peut être considérée comme un type de PP. Cette dernière est régulée par la voie de signalisation non canonique Wnt chez la souris et le xénope. On retrouve également une régulation de la distribution des cils à l'intérieur de la vésicule de Kupffer chez le zebrafish [8]. Ceci suggère dans ce cas que la PP pourrait également être une composante du modèle *ciliaire*.

Par ailleurs, la PP est également capable d'orienter de manière coordonnée et uniforme des structures étendues en prenant en compte la polarité intracellulaire [2]. La PP pourrait ainsi jouer le rôle de mécanisme amplificateur du signal D/G en aval de signaux émanant du cytosquelette [2]. Cette hypothèse est confortée par des données montrant que la perturbation des protéines impliquées dans la PP chez les embryons dépourvus de cils au niveau du nœud (comme chez le poulet) [80], ou dans les cellules non ciliées de l'embryon du xénope [81], perturbe spécifiquement la mise en place de l'axe D/G. Par ailleurs, l'orientation de la PP peut dépendre d'un mécanisme de transport asymétrique nécessitant les microtubules [82] ; ceci renforce l'hypothèse selon laquelle la PP serait impliquée dans la propagation et la coordination de l'information D/G émanant d'un biais initial intracellulaire.

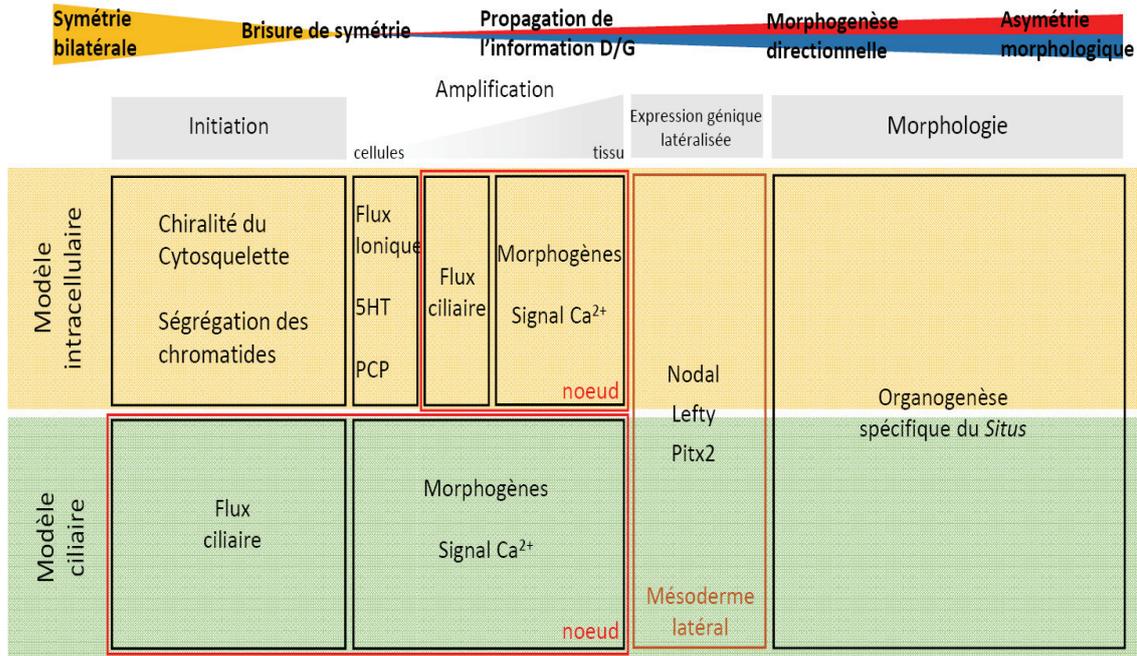


Figure 10. Comparaison des deux modèles d'établissement de l'axe D/G.

Le modèle *intracellulaire* propose que l'asymétrie D/G est initiée au cours des premiers clivages. L'information D/G est ensuite amplifiée par plusieurs mécanismes comme la distribution asymétrique de la sérotonine (5HT) ou la *Planar Cell Polarity* (PCP) puis le flux nodal qui induit la distribution asymétrique de morphogènes et/ou un signal calcique du côté gauche du noeud. Tous ces mécanismes doivent fonctionner correctement pour permettre l'établissement de l'axe D/G. Les espèces qui ne possèdent pas ou qui n'utilisent pas les cils pour l'asymétrie D/G dépendent uniquement des mécanismes précoces. Le modèle *ciliaire* propose que la brisure de symétrie initiale repose uniquement sur le flux nodal généré par les cils. L'étape d'amplification repose dans ce cas uniquement sur la distribution asymétrique des morphogènes et/ou le signal calcique asymétrique.

2.2 L'oursin

Chez l'oursin, l'adulte présente une symétrie radiaire. Il est issu après métamorphose du rudiment. Ainsi la larve pluteus présente une asymétrie D/G transitoire qui se caractérise par la localisation du rudiment exclusivement du côté gauche (le reste de la larve présente une symétrie bilatérale classique) (Figure 11) [83]. Le rudiment contient des précurseurs des cellules germinales. IL est principalement issu de la poche cœlomique gauche et d'une partie de l'ectoderme ventral (Figure 11). Nodal empêche la formation du rudiment du côté droit et détermine donc sa localisation asymétrique [84]. Chez la larve de l'oursin, Nodal est exprimé par un groupe de cellules situé du côté droit à la pointe de l'archentéron [85]. Ceci constitue la première manifestation de l'asymétrie D/G pendant l'embryogenèse de l'oursin. Les cellules exprimant Nodal semblent jouer le rôle d'un organisateur D/G analogue au noeud des mammifères. Elles assurent en effet la mise en place de l'axe D/G par rapport à l'axe D/V et la propagation de l'asymétrie D/G à des tissus distants. De plus, la signalisation Nodal entre

cet organisateur et l'ectoderme dépend de l'activité synergique de Nodal et Univin [85]. La formation de l'hétérodimère Nodal-Univin pourrait ainsi contrôler la propagation du signal induit par Nodal. L'induction et le positionnement de l'organisateur endomésodermique du côté droit dépendent de l'interaction entre des signaux inhibiteurs précoces en aval de la signalisation Notch et des signaux inducteurs tardifs provenant des voies FGF et BMP [83].

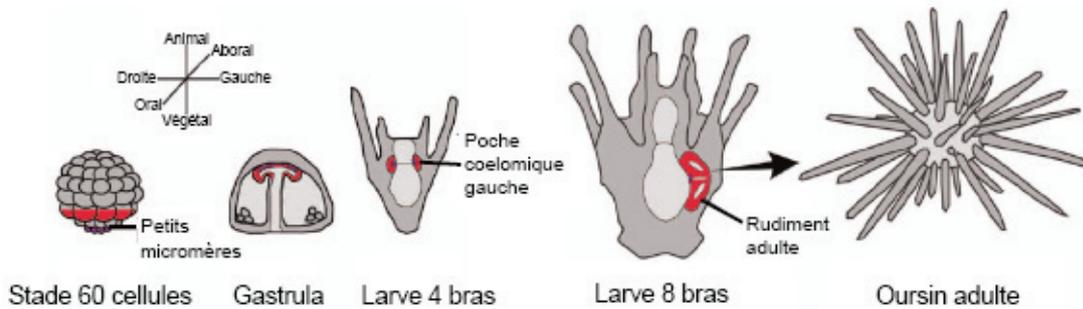


Figure 11. Asymétrie D/G chez l'oursin

Au cours du clivage, le mésoderme et les petits micromères deviennent spécifiés. A la fin de la gastrulation, la descendance de ces deux types cellulaires contribue à la formation des poches coelomiques. Lors des stades larvaires, le rudiment adulte croît à partir de la poche coelomique gauche. Après la métamorphose, ce rudiment croît pour donner l'adulte. L'axe aboral-oral correspond à l'axe dorso-ventral. L'axe animal-végétal est le seul axe établi avant la fertilisation. La spécification de l'axe oral-aboral a lieu précocement lors du clivage. La détermination de l'axe D/G a lieu au stade gastrula tardif. Crédit : [86].

La voie Notch réprime l'expression de *Nodal* du côté gauche de l'archentéron. Cette répression se fait de manière indirecte grâce au rôle de la voie Notch dans l'induction du mésoderme. Comme chez les vertébrés, l'ATPase H^+/K^+ est impliquée dans les étapes précoces de l'établissement de l'axe D/G chez l'oursin [84, 87]. L'inhibition de cette ATPase H^+/K^+ phénocopie l'inhibition de la voie Notch. Ceci suggère, chez l'oursin, que cette pompe agit dans la voie Delta/Notch pour réguler l'asymétrie D/G.

La voie BMP dans l'endomésoderme contrôle l'expression asymétrique de *nodal* au niveau de l'organisateur mais ceci de manière indirecte via un intermédiaire inconnu [83]. Cette voie BMP induit également l'expression de gènes spécifiques à la poche coelomique gauche et participe à la formation du canal hydroporique [83, 88] (une structure tubulaire associée avec la poche coelomique gauche de la larve pluteus).

Par ailleurs, il a été montré que la poche coelomique droite et la poche coelomique gauche présentent chacune un nombre différent de précurseurs des cellules germinales [83, 89, 90]. Nodal est à l'origine de la ségrégation asymétrique des précurseurs de la lignée germinale entre les deux poches coelomiques. De plus, il a été proposé que Nodal pourrait

aussi induire l'apoptose des cellules de la lignée germinale du côté droit (probablement en réprimant l'expression de *nanos* au niveau de la poche cœlomique droite) [83].

3-Asymétrie D/G chez les protostomes

3.1 Le nématode *Caenorhabditis elegans*

3.1.1 *Etapes précoces de la détermination de l'axe D/G chez C. elegans*

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans* l'asymétrie D/G se manifeste précocement par une disposition asymétrique des blastomères au stade six cellules [91, 92]. En effet, entre les stades 4 et 6 cellules, le fuseau mitotique (initialement orthogonal à l'axe A/P) des blastomères ABa et ABp en division subit une rotation d'environ 20° dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Figure 12) [1, 93]. La paire gauche des cellules ectodermes fondatrices (ABal/ABpl) se retrouve alors localisée plus antérieurement que les paires équivalentes sur la droite (ABar/ABpr) [93]. La rotation du fuseau mitotique au stade 4 cellules détermine précocement l'asymétrie viscérale de l'adulte se caractérisant par la position antérieure droite des gonades et une torsion de l'intestin [1]. Cette configuration est due à des contraintes externes relatives à l'espace limité imposé de manière incompressible par l'enveloppe de l'œuf [94].

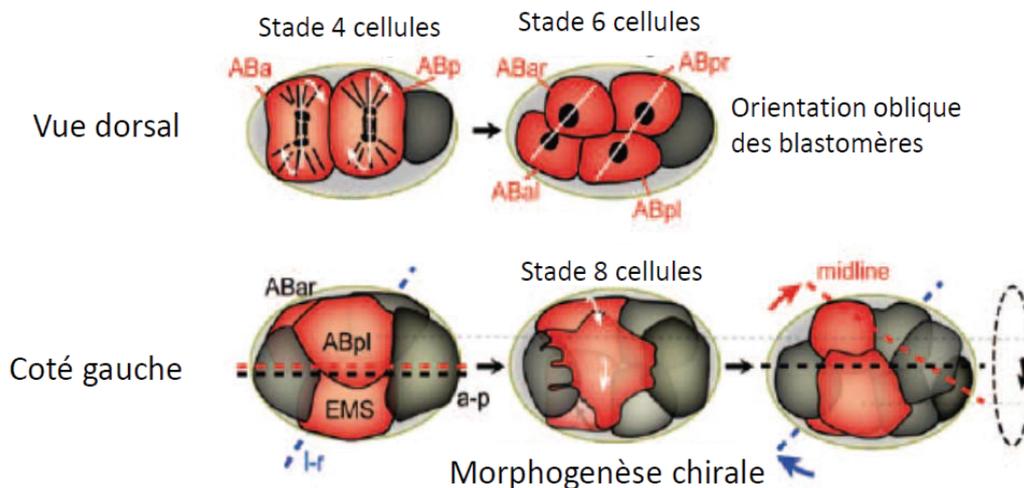


Figure 12. Evènements précoces de brisure de symétrie chez *C. elegans*.

La disposition asymétrique des blastomères au stade 6 cellules correspond à la première asymétrie D/G morphologique. Une morphogénèse chirale opère ensuite au stade 8 cellules et repose sur des réarrangements asymétriques robustes et stéréotypés. Adapté de [93].

Cependant ces contraintes ne constituent qu'une partie du signal de guidage responsable de l'orientation oblique des blastomères en division. La latéralité des fuseaux obliques ABA/p semble donc également provenir d'une asymétrie D/G intrinsèque aux cellules [93]. De manière générale, l'orientation du fuseau chez *C. elegans* est contrôlée par des signaux de polarité impliquant les protéines PAR et la signalisation induite par la protéine G hétérotrimérique (activée par une voie de signalisation indépendante des récepteurs) [95, 96]. Ainsi, les protéines G et les protéines PAR agissent avec la dynéine pour imposer des forces de traction différentielles aux microtubules astraux. Il a été montré que les mutants affectant la sous-unité $G\alpha$, appelée *gpa-16*, présentent une orientation aléatoire du fuseau [97]. GPA-16 agit en association avec RIC-8 (requis pour le recrutement au cortex de GPA-16) et GPR-1/2 (impliqué dans l'activation de GPA-16). Ces deux composants participent à la génération des forces de traction [98, 99]. En outre les embryons mutants pour *gpa-16* présentent des forces de traction nettement diminuées et se divisent de manière symétrique [100]. Par conséquent, un attachement correct du fuseau aux composants du cortex qui génèrent les forces de traction est indispensable à la mise en place de l'axe D/G chez *C. elegans*. Cependant ces données n'expliquent pas l'orientation invariante du fuseau [93].

De manière intéressante, des travaux récents mettent en évidence une interaction dynamique entre les fuseaux mitotiques et le réseau d'actomyosine [101, 102]. Cette interaction a lieu au niveau des sites de contact entre l'extrémité des microtubules et le cortex. Avant la première division cellulaire, l'embryon au stade 1 cellule tourne d'un angle de 120° [93]. Le sens de rotation invariant par rapport à l'axe A/P révèle aussi l'existence d'une chiralité intrinsèque. Christian Pohl suggère qu'une structure chirale pourrait exister au niveau de la liaison entre le cytosquelette d'actine et les microtubules. La chiralité intrinsèque pourrait être traduite durant la cytokinèse, par un mécanisme qui reste inconnu, en une asymétrie D/G morphologique [93].

3.1.2 Morphogenèse asymétrique D/G

Suite à l'orientation oblique des blastomères en division, les cellules embryonnaires sont impliquées dans une morphogenèse asymétrique D/G [103] que Pohl et Bao ont appelée morphogenèse chirale. Cette morphogenèse repose sur des réarrangements asymétriques très robustes et stéréotypés. Ainsi l'asymétrie D/G initiale générée par l'orientation oblique des blastomères est renforcée par des mouvements cellulaires afin de constituer la ligne médiane. Lors de sa formation, la ligne médiane se différencie de l'axe A/P et se retrouve inclinée vers

la droite. Par ailleurs, Pohl et Bao montrent que le côté gauche présente un nombre supérieur de cellules par rapport au côté droit.

Les cellules filles, symétriques par rapport à la ligne médiane inclinée, ont des destins cellulaires équivalents. Pohl et Bao ont donc étudié le mécanisme qui induit l'asymétrie D/G durant la morphogenèse chirale. Ils ont montré que les cellules filles ABpl et ABpr présentent des comportements cellulaires différents. En effet, ABpl subit des changements de forme marqués (formation de lamellipodes et filopodes) et se déplace antéro-ventralement alors que l'activité protrusive de ABpr reste limitée. Cette différence de comportement résulte d'une régulation différentielle du cortex d'actomyosine qui implique la voie de signalisation non canonique Wnt [103].

De manière intéressante, ces résultats mettent en lumière, chez *C. elegans*, les mécanismes cellulaires de propagation de la brisure de symétrie et permettent d'identifier deux phases dans la détermination D/G :

- La brisure de symétrie initiale qui repose sur la disposition asymétrique des blastomères au stade 6 cellules [91, 92]. Cette brisure génère l'information directionnelle.
- La propagation de l'information directionnelle reposant sur une régulation asymétrique de la contractilité du cortex d'actomyosine et de l'activité protrusive entre les cellules filles ABpl et ABpr [103].

3.1.3 Implication de la voie Notch

A partir du stade 12 cellules, la mise en place de l'axe D/G s'achève par plusieurs activations successives de la voie Notch du côté gauche de l'embryon [93].

Poole et Hobert ont montré que l'arrangement chiral des blastomères au stade six cellules et l'activation ultérieure de la voie Notch déterminent l'asymétrie fonctionnelle D/G de la paire bilatérale de neurones ASEL/ASER [104]. Ceci montre donc qu'à la différence des vertébrés, l'asymétrie D/G viscérale déterminée précocement influence l'asymétrie D/G neuronale qui se met en place plus tardivement au cours du développement (cf. section 4).

3.1.4 La polarité planaire et la voie Wnt contrôlent-elles la détermination D/G chez C elegans ?

L'activation de la voie Wnt est requise pour induire la dynamique du cortex d'actomyosine qui contrôle la mise en place de l'axe D/G [103]. La polarité planaire n'est pas

retrouvée sous sa forme canonique chez *C. elegans*. Cependant Langenhan et col. ont rapporté qu'un homologue des latrophilines des vertébrés appelé Lat-1 joue un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité tissulaire chez *C. elegans* [105]. Lat-1 ressemble structurellement à flamingo qui est un composant essentiel de la polarité planaire (voie canonique) chez d'autres organismes. De plus, *lat-1* interagit génétiquement avec les gènes de la voie Wnt et présente une asymétrie D/G marquée lors de la morphogenèse de l'épiderme. L'ensemble de ces données suggère donc qu'une voie similaire à la polarité planaire contrôle, chez *C. elegans*, la polarité tissulaire requise pour la détermination D/G et la morphogenèse épithéliale [93].

3.2 Les spiraliens

Les spiraliens regroupent les Entoproctes, les Parenchymiens, les Mollusques, les Siponcles, et les Annélides. Dans ce taxon, dès que l'axe dorsoventral est spécifié, l'axe de symétrie bilatérale est établi puis les côtés gauche et droit sont définis. La symétrie bilatérale est donc déterminée durant les stades précoces de l'embryogenèse. Les spiraliens sont caractérisés par l'orientation oblique des plans de clivage par rapport au pôle animal-végétatif (clivage en spirale). Une morphogenèse asymétrique induit ensuite des asymétries D/G chez la larve de certains spiraliens. Dans certains cas cette asymétrie D/G larvaire détermine la mise en place de l'axe D/G chez l'adulte [106]. Dans d'autres cas, ces asymétries sont uniquement détectées au stade larvaire alors que l'adulte présente une symétrie bilatérale. Les marqueurs d'asymétrie D/G sont assez divers chez les spiraliens. Certaines asymétries sont trouvées dans les régions sensorielles (némertiens et plathelminthes), d'autres dans les cils locomoteurs et les connections nerveuses (plathelminthes). On retrouve également des marqueurs d'asymétrie au niveau de l'intestin des annélides (courbure chirale de l'intestin) ou l'enroulement de la coquille chez l'escargot [106].

Les mollusques (excepté les céphalopodes) présentent une segmentation en spirale. La plupart des espèces d'escargots (de même que certains bivalves et tous les polyplacophores) présente un clivage égal alors que chez d'autres espèces d'escargots, de bivalves, de scaphopodes et de solenogastres, on retrouve un clivage inégal [106]. Durant les premières divisions, un des macromères généré au stade 4 cellules (D macromère) et ses descendants constituent le quadrant dorsal-postérieur de l'embryon. Cette étape correspond à la spécification du quadrant D qui joue le rôle d'organisateur particulièrement chez les escargots, les polyplacophores et les scaphopodes [106]. Le quadrant D peut être spécifié de

deux manières : soit par une interaction cellule-cellule chez les embryons à clivage égal, ou par la localisation cytoplasmique de facteurs spécifiques chez les embryons à clivage inégal. Une fois spécifié, le quadrant D contrôle, par le biais d'interactions cellulaires, le développement des quadrants adjacents A, B et C qui sont respectivement à l'origine des régions gauche, ventral et droite. Chez les mollusques, la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) est impliquée dans la spécification de l'axe dorsoventral et de manière indirecte dans la détermination de l'axe D/G [106].

Chez l'escargot, la chiralité se manifeste par le marqueur externe de l'enroulement de la coquille et par l'organisation du corps. L'enroulement de la coquille (regardé depuis son extrémité) peut se faire soit dans le sens **dextral** (sens des aiguilles d'une montre), ou dans le sens inverse **sinistral**. La configuration dextrale est la plus commune chez les escargots et pourrait constituer l'état ancestral chez les gastéropodes. Seule une minorité d'espèces présente un enroulement sinistral comme *Physa acuta* [1]. La génétique classique a permis de montrer que le sens d'enroulement de la coquille est hérité maternellement par un déterminant cytoplasmique déposé dans l'œuf et issu d'un gène appelé *Dextral*. La nature moléculaire de ce gène reste inconnue [106, 107]. De manière intéressante il a été montré que le phénotype dextral est, comme chez la drosophile dominant sur le phénotype sinistral. Par ailleurs plusieurs études ont rapporté que la direction de la première segmentation spirale (3^{ème} division cellulaire) est importante pour déterminer l'axe D/G [106]. La direction de cette segmentation est dépendante de la dynamique du cytosquelette. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a ainsi permis d'établir que des modifications du cytosquelette d'actine (mais pas de microtubules) affectent la mise en place de l'axe D/G chez l'escargot [108]. Plus récemment, Kuroda et col. ont élégamment démontré que l'inversion, par un moyen mécanique, de la direction du clivage dans l'embryon précoce induit une inversion de la chiralité de la coquille et de l'asymétrie des autres organes internes [109].

Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère que c'est la dynamique du cytosquelette sous contrôle génétique qui détermine l'arrangement des cellules, la direction du clivage dans l'embryon précoce et finalement la mise en place de l'axe D/G chez l'escargot adulte. Dès lors que l'axe D/G est déterminé lors des stades précoces de clivage, l'arrangement des quadrants se fait de manière cohérente avec cette chiralité. De surcroît, comme chez le xénope ou *C. elegans*, le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la détermination précoce de l'axe D/G chez l'escargot. Ces données vont dans le sens du *modèle*

intracellulaire présenté précédemment (voir section 2.1.2). Elles renforcent également l'idée d'un mécanisme précoce de détermination de l'axe D/G chez les invertébrés.

Nodal est exprimé de manière asymétrique chez l'escargot et son expression corrèle avec la chiralité et l'identité des différents quadrants [110]. Or *nodal* est, comme nous l'avons vu précédemment, également impliqué dans la détermination D/G chez les deutérostomes (notamment les échinodermes, les ascidies et les vertébrés).

3.3 *Drosophila melanogaster*

L'utilisation de la drosophile comme modèle d'étude de l'asymétrie D/G ne s'est développée que récemment. L'origine zygotique de l'information D/G a été démontrée en 2005 par Hayashi et col. [111]. Ces derniers ont montré que l'axe D/G de la drosophile n'est pas prédéterminé par des déterminants maternels. De plus l'axe D/G des organes adultes et embryonnaires peut être inversé chez des mutants homozygotes provenant de mères hétérozygotes [112]. Ceci conforte l'idée d'une définition zygotique de l'axe D/G dont l'orientation est définie par rapport à l'axe A/P dans les étapes précoces du développement.

3.3.1 Les marqueurs asymétriques D/G chez la drosophile

Chez la drosophile, les marqueurs morphologiques les plus robustes de l'asymétrie D/G reposent essentiellement sur des enroulements directionnels de structures tubulaires telles que l'intestin (embryonnaire, larvaire et adulte), l'enroulement des testicules et la rotation du génitalia chez le mâle. Cet enroulement directionnel est également retrouvé chez les vertébrés. C'est le cas par exemple pour la courbure directionnelle du cœur embryonnaire ou de l'intestin.

3.3.1.1 L'intestin

Chez la drosophile, l'intestin est constitué de trois parties et provient de l'invagination de cellules lors du stade blastoderme précoce. La partie la plus antérieure de l'intestin appelée *foregut* correspond à l'œsophage chez l'humain, la partie centrale ou *midgut* correspond à l'estomac humain et l'intestin, la partie la plus postérieure appelée *hindgut* équivaut à la partie colo-rectale du système digestif humain.

3.2.1.1.1 L'intestin embryonnaire

L'intestin embryonnaire de la drosophile est initialement symétrique. Une asymétrie D/G stéréotypée apparaît entre les stades embryonnaires 13 et 17. Cet enroulement asymétrique de

l'intestin embryonnaire est d'abord apparent au niveau de l'*hindgut* puis peu après dans le *foregut* et enfin dans le *midgut* [112, 113]. La morphogenèse asymétrique de l'intestin embryonnaire peut être résumée comme suit (Figure 13):

1. L'épithélium monocouche de l'*hindgut* voit ses cellules s'allonger et se réorganiser. A la fin du stade 13, ceci mène à une torsion de 90° vers la droite (dextrale) de la «crosse» de l'*hindgut* assurant la jonction avec le *midgut*.
2. Au stade 15 c'est le *foregut* qui se tord d'environ 360° vers la gauche pour former une hélice sinistrale.
3. Après le stade 15, le proventriculus qui lie le *foregut* et le *midgut* s'incline vers la gauche.
4. Au stade 16 précoce, trois constriction circulaires divisent le *midgut* en quatre chambres alignées le long de l'axe A/P mais légèrement incurvées le long de l'axe D/V.
5. Enfin, plus tard lors du stade 16, la seconde chambre se déplace vers la droite brisant ainsi la symétrie D/G.
6. D'autres circonvolutions et courbures aboutissent à un *midgut* complètement asymétrique au stage 17.

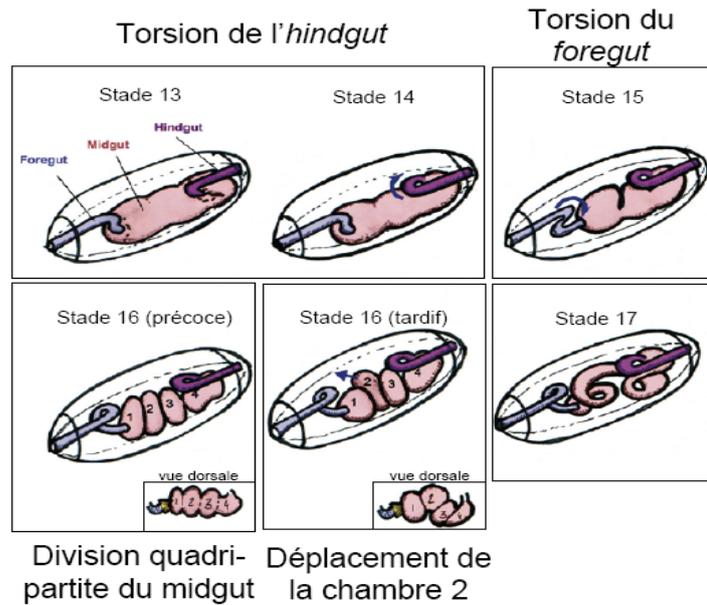


Figure 13. Asymétrie D/G dans l'intestin embryonnaire de la drosophile.

Après achèvement de la fusion du *midgut* (rose clair) avec le *foregut* antérieur (bleu clair) et le *hindgut* postérieur (violet) au stade 13, l'intestin développe une asymétrie D/G stéréotypée entre le stade 13 et le stade 17 de l'embryogenèse. Au stade 14, le *hindgut* effectue une torsion de 90° vers la gauche. Au stade 15, le *foregut* s'enroule vers la gauche pour former une hélice sinistrale (à un tour). Après le stage 15, le proventriculus, trouvé du côté postérieur du *foregut*, s'incline vers la gauche (en jaune dans la figure de détail des stades 16 précoces et tardifs). Au stade 16 précoce, 3 constriction circulaires divisent le *midgut* en 4 chambres alignées selon l'axe A/P. Lors du stade 16, la seconde chambre se décale vers la droite pour briser la symétrie D/G. L'acquisition de sinuosités et coudes supplémentaires génère un *midgut* complètement asymétrique au stade 17. Modifié de [112].

De manière intéressante, les asymétries D/G de chaque partie de l'intestin s'établissent de manière indépendante. Il est donc possible d'inverser l'axe D/G dans certaines structures de l'intestin indépendamment des autres. Plusieurs mutations affectant l'axe D/G de certaines parties de l'intestin ont ainsi été identifiées alors que les autres parties ne sont pas affectées [112].

3.2.1.1.2 L'intestin adulte

Comme l'intestin embryonnaire, l'intestin adulte présente une boucle dextrale stéréotypée de l'*hindgut* (Figure 14) [114]. De manière intéressante, Takashima et col. ont mis en évidence de fortes similitudes entre les mammifères et la drosophile concernant le renouvellement et la différenciation des cellules souches intestinales [115, 116]. L'étude de la morphologie cellulaire dans l'épithélium de l'*hindgut* et de la cinétique de prolifération cellulaire leur ont permis de montrer que la partie antérieure de l'*hindgut* (à la frontière entre *midgut* et *hindgut*) correspond à une zone de prolifération qu'ils ont nommé *hindgut proliferation zone* (HPZ) [115]. Cette zone est constituée de cellules localisées antérieurement, à prolifération lente, qui engendrent une descendance proliférant rapidement

vers la partie postérieure. Ces cellules à leur tour produisent des cellules de l'*hindgut* différenciées localisées encore plus postérieurement. Les auteurs proposent que les cellules proliférant lentement se comportent comme des cellules souches. Cette zone de prolifération semble jouer un rôle important dans le développement de l'*hindgut* [115]. En effet, chez la larve, ces cellules prolifèrent pour générer les tissus adultes en remplaçant les cellules larvaires mortes. Cependant ces cellules diffèrent des autres types de cellules progénitrices trouvées chez la drosophile car elles persistent dans l'insecte adulte. En effet, chez l'adulte, elles prolifèrent et produisent de manière constitutive de nouvelles cellules qui formeront l'*hindgut* (mais de manière plus lente que pendant la métamorphose) [115].

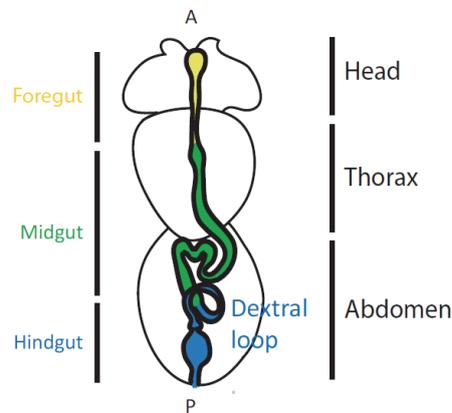


Figure 14. Vue dorsale de l'intestin chez la drosophile adulte.

L'intestin adulte de *Drosophila melanogaster* est divisé en trois compartiments distincts : le *foregut*, le *midgut* et le *hindgut*. L'*hindgut* adulte effectue une boucle dextro-stérique au cours du stade pupal.

3.3.1.2 Le génitalia

Chez la drosophile, les structures épidermiques sont dérivées des disques imaginaux. Le terminalia de l'adulte incluant les tissus somatiques composant le génitalia et l'analia proviennent du disque génital. Ce disque est le seul à être localisé sur la ligne médiane ventrale alors que les autres disques imaginaux sont trouvés par paires de chaque côté de la larve. De plus, il présente un dimorphisme sexuel marqué et est constitué de trois segments embryonnaires appelés A8, A9 et A10 [112].

Le disque génital se forme durant l'embryogenèse chez le mâle comme chez la femelle. Les trois primordia du disque génital sont spécifiés par les gènes homéotiques *abdominal-A*, *Abdominal-B* et le gène à homéodomaine *caudal*. Ces gènes sont requis pour le développement correct du disque génital dans son ensemble. Chaque primordium a une partie antérieure et une partie postérieure (Figure 15). L'activité du gène de détermination du sexe *sex lethal (sxl)* chez les femelles conduit à un épissage spécifique du gène *doublesex* et à la

production de la protéine DsxF. En revanche *sxl* est inactif chez le mâle ce qui mène à la production de la protéine DsxM. Par ailleurs le génitalia du mâle provient du segment A9, celui de la femelle dérive du A8 ; alors que l'analia provient du segment A10 chez le mâle et la femelle [112]. Dans les deux sexes le primordium dont dérive le génitalia (A9 chez le mâle et A8 chez la femelle) prolifère et se différencie alors que le développement des autres primordia (A8 chez le mâle et A9 chez la femelle) est empêché. Ces primordia réprimés sont à l'origine de la huitième petite tergite chez le mâle et du parovaria chez la femelle [117].

Lors de la métamorphose, le disque génital s'invagine de manière à exposer sa surface apicale et adopter une forme circulaire (Figure 15) [112]. Le premier jour après formation de la puppe (24h AFP), le segment A8 forme un anneau de cellules entourant les segments A9 et A10 ; le deuxième jour (27-36h AFP) les structures génitales se connectent aux gonades. Puis la plaque génitale (ou terminalia) effectue une rotation stéréotypée de 360° dans le sens horaire ou **dextral** induisant l'enroulement du canal déférent (*spermiduct*) autour de l'intestin (Figure 15) [112].

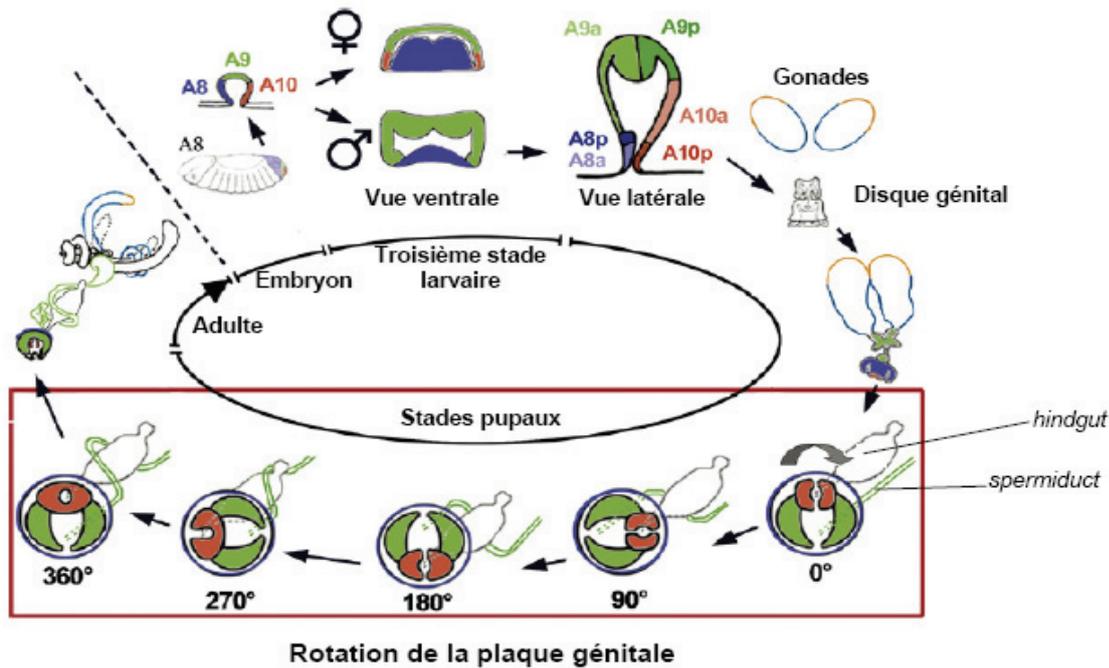


Figure 15. Cycle de développement du disque génital mâle

Dans l'embryon, les cellules du disque génital précurseur appartenant aux segments A8, A9 et A10 (en bleu, vert et rouge respectivement), se ségrègent pour former une structure ressemblant à un sac appelé disque génital. Au cours des stades larvaires, le disque génital présente un haut degré de prolifération et de dimorphisme sexuel. Les protéines Dsx^M et Dsx^F sont impliquées dans la différenciation mâle et femelle respectivement du disque génital. Chaque segment du disque génital est composé d'un compartiment antérieur et postérieur (comme illustré par le code couleur dans la vue latérale du disque au troisième stade larvaire). Au cours des stades pupaux, le disque s'invagine, exposant sa surface apicale à l'extérieur, et s'étire pour se connecter aux gonades 25 heures APF environ. Puis le disque effectue une rotation dextre de 360° conduisant à l'enroulement progressif du canal déférent (*spermiduct*) autour de l'intestin (*hindgut*). Adapté de [111].

3.3.1.3 Les testicules

Les gonades de la drosophile se développent, au stade embryonnaire, indépendamment du disque génital à partir de cellules germinales primordiales qui migrent depuis le pôle postérieur, lors du stade blastoderme, jusqu'à leur position finale de chaque côté de la ligne médiane dans le segment A5 au stade 15. La spermatogenèse commence lors du premier stade larvaire [112]. Par ailleurs, à partir du deuxième jour APF, les testicules changent de forme passant d'une forme allongée à la forme spiralée finale observée chez l'adulte. L'enroulement des deux testicules se fait dans le sens horaire ou dextral (lorsque l'on regarde le testicule depuis son extrémité vers sa base) ce qui en fait un marqueur D/G robuste [114]. L'enroulement du testicule de l'adulte est, comme la rotation du genitalia, contrôlé par le déterminant dextral MyoID (abordé plus en détail dans la section 3.3.3.3).

3.3.1.3 Asymétries fonctionnelles et morphologiques

3.3.1.3.1 Le Cerveau

Chez la drosophile on peut observer une structure cérébrale localisée de manière asymétrique. Cette structure, appelée corps asymétrique positif à la Fascioline 2, est retrouvée à proximité des *mushroom bodies* [118]. Pour la grande majorité des mouches sauvages, ce corps asymétrique est situé dans l'hémisphère droit alors que 8% des mouches sauvages présentent une symétrie cérébrale associée à un manque de mémoire à long terme. Ce marqueur n'est donc pas stéréotypé et ne semble pas dépendre du programme génétique contrôlant l'asymétrie morphologique et viscérale. En effet, la localisation du corps asymétrique n'est pas contrôlée par MyoID [1].

3.3.1.3.2 Les Reins

Les reins de la drosophile présentent une asymétrie morphologique puisque la paire la plus à droite des tubules de Malpighi se ramifie antérieurement alors que la paire la plus à gauche se positionne postérieurement dans l'abdomen. Chintapalli et col. ont comparé le transcriptome des tubules de Malpighi du côté droit par rapport au transcriptome des tubules du côté gauche [119]. Ils ont constaté que certains gènes codant les fonctions de base des tubules (transport, signalisation) sont uniformément exprimés, alors que d'autres fonctions comme l'immunité innée, le transport du calcium ou l'activité glutaminase sont restreintes au côté gauche ou au côté droit des tubules de Malpighi. De manière intéressante les auteurs suggèrent une interaction fonctionnelle réciproque entre ces fonctions asymétriques et le positionnement asymétrique de l'intestin dans la cavité.

3.3.2 Mutants affectant l'asymétrie D/G sans inversion de l'axe

3.3.2.1 Rôle de la voie de signalisation JNK dans la détermination D/G

La voie de signalisation JNK a été retrouvée impliquée à la fois dans la rotation du génitalia et dans la détermination D/G de l'intestin. Ainsi, des phénotypes de rotation partielle du disque génital ont été observés chez les mouches portant des allèles perte de fonction de la Jun N-terminal Kinase Kinase (JNKK) *hemipterous* et chez les mouches sur-exprimant la phosphatase JNK *puckered* (Puc) [112, 120, 121]. De même des phénotypes similaires ont été observés pour des mutations dans le gène pro-apoptotique *head involution defective* (*hid*) et chez les mouches pour lesquelles l'apoptose dans le disque génital est bloquée par l'expression de la protéine inhibitrice des caspases p35 [112, 122, 123]. Comme la voie JNK et les voies apoptotiques interagissent entre elles, l'ensemble de ces données suggère un rôle

de la voie JNK dans la régulation de l'apoptose requise pour la rotation correcte du génitalia. Enfin, la voie PVF1/PVR (homologue de la signalisation PDGF/VEGF chez les vertébrés) est capable d'activer la voie JNK dans le disque génital [122].

La voie de signalisation JNK est également impliquée dans la latéralisation du *midgut* suggérant un rôle plus général de la voie JNK dans l'asymétrie D/G [112]. L'activation comme l'inhibition de cette voie perturbent le réarrangement asymétrique des cellules dans le muscle viscéral circulaire entourant l'épithélium de l'intestin. Un situs aléatoire est alors observé dans le *midgut* antérieur. La voie JNK doit donc être finement régulée pour permettre la rotation du génitalia et la latéralisation du *midgut*.

3.3.2.3 Fascicline 2 et les terpénoides

Fascicline 2 est un membre de la super famille des immunoglobulines jouant un rôle dans la croissance et le guidage axonal. Cette immunoglobuline a été identifiée dans un crible génétique recherchant les mutations affectant la rotation du génitalia. Les mutants *fas2^{spin}* présentent une rotation dextrale incomplète de leur génitalia. L'absence d'inversion de l'axe a conduit les auteurs à proposer que chez ces mutants, c'est la rotation *per se* qui est affectée plutôt que la détermination D/G [124]. De plus, les auteurs ont montré que Fas2 est impliquée dans le métabolisme de l'hormone juvénile. Cette hormone est un analogue de l'acide rétinoïque dont le rôle dans la détermination D/G chez les vertébrés est bien documenté [112]. Les mutants *fas2^{spin}* présentent un niveau élevé d'hormone juvénile au stade pupal [124]. Les auteurs ont montré que les traitements avec des analogues de l'hormone juvénile conduisent à une rotation incomplète alors qu'une réduction de la signalisation dépendante de l'hormone juvénile sauve le phénotype des mutants *fas2^{spin}* [124]. Cette étude permet donc de différencier le processus d'établissement de l'axe D/G de la morphogenèse des organes le long de cet axe.

3.3.2.2 Gènes impliqués dans l'établissement de l'axe D/G dans l'intestin embryonnaire

Kuroda et col. ont récemment rapporté que *frizzled* (*fz2*) et *Wnt4* (qui codent respectivement un récepteur et un ligand de la voie Wnt) sont impliqués dans la détermination D/G de la partie antérieure du *midgut* [125]. De même *arrow* (*arr*) codant un cofacteur impliqué dans la voie Wnt joue également un rôle dans la détermination D/G de la partie antérieure du *midgut*. Les auteurs suggèrent que c'est la voie canonique Wnt/ β -caténine qui joue un rôle dans la détermination D/G de l'intestin embryonnaire [125]. Or, de manière intéressante, chez le zebrafish, la voie canonique Wnt/ β -caténine joue également un rôle dans la détermination D/G [126, 127]. Par conséquent, la contribution de la voie canonique Wnt/ β -

caténine dans l'asymétrie D/G pourrait avoir été conservée au cours de l'évolution entre vertébrés et invertébrés.

Single-minded (sim) code un facteur de transcription. Sim est impliqué dans la spécification de la ligne médiane ventrale requise pour le développement correct de l'ectoderme ventral. Les embryons mutants pour *sim* présentent des défauts de latéralisation de l'intestin [128]. Par ailleurs, la surexpression de *sim* dans l'*hindgut* est suffisante pour induire une inversion localisée de l'axe D/G. Par conséquent, il a été suggéré que *sim* pourrait agir directement sur l'établissement de l'axe D/G en plus de son rôle dans la détermination de la ligne médiane ventrale [112].

Pebble (pbl) a été identifié comme un gène requis pour la détermination D/G de l'*hindgut* embryonnaire [129]. Ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des RhoGEF qui présente de multiples fonctions. Les embryons homozygotes pour un mutant nul de *pbl* présentent un *situs* aléatoire. *Pbl* code une protéine qui est requise pour la cytokinèse et la transition épithélial-mésenchyme chez la drosophile. Cependant la fonction précise de Pbl dans l'asymétrie D/G n'a pas pu être déterminée. Les embryons homozygotes pour le mutant nul de *pbl* présentent un nombre réduit de cellules dans l'épithélium de l'*hindgut*. Cette réduction du nombre de cellules semble être responsable des défauts d'asymétrie observés [129].

Zipper (zip), codant chez la drosophile pour la chaîne lourde de la Myosine II, a été identifié comme un gène requis pour la détermination D/G du *midgut* antérieur embryonnaire [130]. Cette Myosine II est requise dans deux étapes lors de la détermination de l'axe D/G au niveau du *midgut* antérieur embryonnaire. D'une part, elle introduit un biais D/G au niveau de l'orientation des cellules du muscle viscéral circulaire qui recouvre l'épithélium du *midgut*. D'autre part, cette myosine est impliquée dans la rotation latéralisée du *midgut* embryonnaire. Par conséquent les auteurs suggèrent que la Myosine II joue un rôle important dans les cellules du muscle viscéral circulaire en générant la force qui permet la morphogénèse asymétrique

3.3.2.4 Gènes impliqués dans la rotation directionnelle du génitalia

La Ténectine est impliquée dans la rotation du génitalia et donc dans les étapes en aval de la détermination D/G. La ténectine est une protéine de la matrice extracellulaire qui est régulée de manière hormonale et se lie à l'intégrine PS2 [131].

Lee et col. rapportent que UVRAG, un suppresseur de tumeur connu pour réguler l'autophagie et l'endocytose joue un rôle dans la rotation du génitalia [132]. Les auteurs

montrent que lors de la rotation du génitalia, UVRAG contrôle l'endocytose puis la dégradation du récepteur Notch.

3.3.3 Brisure de symétrie chez la drosophile

3.3.3.1 Mise en évidence du rôle déterminant de MyoID dans l'asymétrie D/G

3.3.3.1.1 MyoID et mutants *situs inversus*

Les mutants qui affectent la détermination D/G précédemment décrits présentent des phénotypes variables et faiblement pénétrants en plus d'être impliqués dans d'autres aspects du développement. Cependant la mise en évidence d'un locus unique chez la drosophile, dont les mutations induisent une inversion des marqueurs D/G à la fois chez l'embryon (intestin) et chez l'adulte (testicules, genitalia et intestin), a apporté des preuves génétiques solides pour proposer l'existence d'une voie spécifique à l'axe D/G. Chez la drosophile, ce locus unique code l'homologue de la Myosine non conventionnelle de type ID (MyoID) [4, 114]. Ceci implique également que le cytosquelette d'actine soit impliqué dans la détermination D/G chez la drosophile ce qui est cohérent avec les données disponibles chez les autres protostomes : spiraliens et *C. elegans* [112].

A ce jour deux autres mutants *situs inversus* ont été identifiés dans le monde animal : l'un correspondant au gène *situs inversus* de la souris : *inversin* [133] et l'autre de nature moléculaire indéterminée chez les escargots *Lymnea* [107]. Il a été montré que *inversin* code une protéine transmembranaire possédant des répétitions ankyrine dont la fonction dans l'asymétrie D/G reste pour le moment mal définie. Chez les escargots *Lymnea*, la mutation d'un unique gène dextralisant conduit à l'inversion de l'enroulement de la coquille (génération d'un enroulement sinistral) [112].

3.3.3.1.2 Expression de MyoID dans les primordia

L'expression et la fonction de MyoID sont restreintes à une très courte période au cours du développement [112]. MyoID est exprimé de manière symétrique dans les primordia de plusieurs organes asymétriques. Par ailleurs seules des régions restreintes de chaque primordium contrôlent la détermination D/G des différents organes asymétriques à différents stades (récapitulé dans le tableau 1).

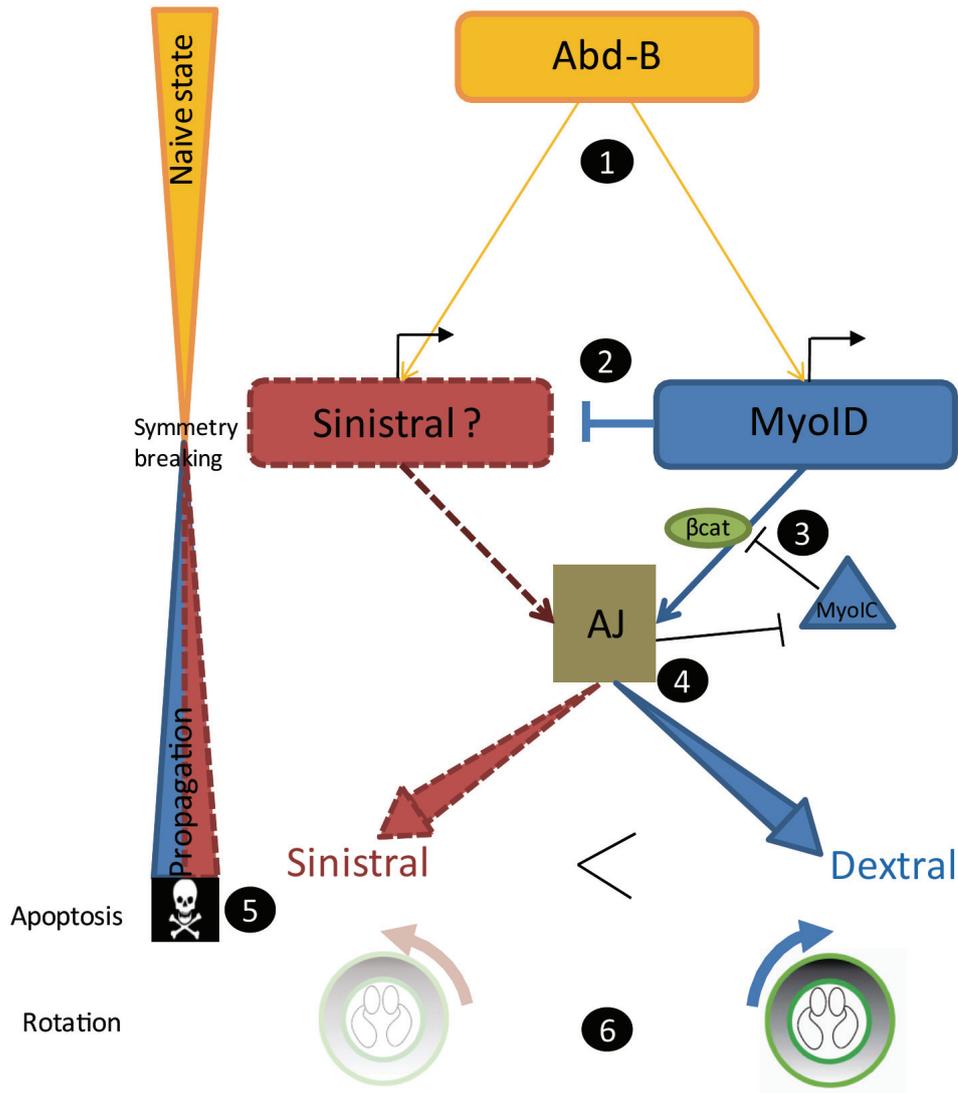


Figure 16. Etapes conduisant à la rotation directionnelle du génitalia

(1) Abd-B contrôle l'activation transcriptionnelle du déterminant sinistral et du déterminant dextral MyoID. (2) MyoID est dominant sur le déterminant sinistral et est recruté aux jonctions adhérentes par la β caténine. La DE-Cadhérine réprime alors l'activité anti-dextral de MyoIC (3) et favorise l'activité de MyoID (4). La rotation du génitalia d'un angle de 360° est issue d'un processus additif impliquant deux domaines en forme d'anneau. Une mort cellulaire (5) localisée à la frontière entre les deux anneaux autorise la rotation du génitalia pendant la métamorphose (6).

| Organes asymétriques | Fenêtre temporelle d'expression de MyoID | Régionalisation de l'expression de MyoID dans chaque primordium | Activité morphogénétique de MyoID | Références |
|---|---|--|---|---|
| <i>midgut</i> et <i>hindgut</i> embryonnaires | entre le stade 12 et le stade 14 | épithélium de l' <i>hindgut</i> embryonnaire | contrôle de l'asymétrie D/G du <i>midgut</i> et de l' <i>hindgut</i> embryonnaires. | [114] |
| <i>hindgut</i> de l'adulte | du stade larvaire L3 au début du stade pupal | cellules antérieures de l'HPZ | contrôle de l'asymétrie D/G de l' <i>hindgut</i> | [114] N Gonzalez-Morales, (communication personnelle) |
| disque génital mâle | du stade larvaire L3 au début du stade pupal | sous-ensemble de cellules du segment A8 du disque génital | contrôle de la rotation du génitalia | [4, 134] |

Tableau 1. Régionalisation de l'activité de MyoID.

Dans l'intestin, la déplétion de l'activité de MyoID mène à l'inversion complète de l'*hindgut* à la fois chez l'adulte et l'embryon et induit une hétérotaxie apparente du *midgut* embryonnaire sans affecter le *foregut* (Tableau 1) [114]. Par conséquent l'asymétrie D/G s'établit de manière indépendante à MyoID dans le *foregut*, alors que dans les deux autres parties de l'intestin l'axe D/G est déterminé par MyoID. Différents mécanismes peuvent donc être impliqués dans l'établissement de l'axe D/G dans les différentes parties d'une même structure [112]. Par ailleurs, la mise en place de l'axe D/G sous le contrôle de MyoID se fait de manière indépendante dans différents primordia. Ainsi, la déplétion de l'activité de MyoID spécifiquement dans le segment A8 du disque génital, n'affecte pas l'asymétrie de l'intestin embryonnaire et adulte (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle) et des testicules [112].

L'établissement de l'axe D/G dans l'*hindgut* adulte est contrôlé par le déterminant dextral MyoID (Tableau 1) [114]. Notre équipe vient de montrer que MyoID est exprimé uniquement par un sous-ensemble de cellules progénitrices appartenant à l'HPZ et localisées à la limite *midgut-hindgut*. Plus précisément, l'expression du déterminant dextral est restreinte

aux quelques cellules progénitrices de l'HPZ, les plus antérieures, qui expriment Wingless (Wg) (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle). Conjointement aux travaux de Takashima S et col. [135] notre équipe (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle) a montré que les cellules exprimant MyoID sont capables, au cours de la métamorphose (9-10 heures APF) de migrer antérieurement pour envahir les territoires cellulaires du *midgut*. Ces cellules se différencient ensuite en entérocytes du *midgut* [135].

3.3.3.1.3 Structure et fonction cellulaire de MyoID dans la détermination D/G

MyoID est un moteur moléculaire se déplaçant sur les filaments d'actine et constitué de trois domaines protéiques principaux: la tête motrice portant l'activité catalytique (site de liaison à l'ATP) et le domaine de liaison à l'actine, le cou qui se lie aux chaînes légères régulatrices et agit comme un bras de levier et la queue qui se lie vraisemblablement à des cargos. MyoID colocalise avec l'actine filamenteuse *in vivo* [112]. En outre des interactions génétiques avec des régulateurs de l'actine tels que la profiline (non publié), la famille des petites GTPases Rho et la Moésine [4, 114] montrent que MyoID requiert un cytosquelette d'actine intact pour contrôler la détermination D/G. Outre son rôle potentiel dans le remodelage des jonctions adhérentes (qui sera abordé dans la section 3.3.3.3), MyoID interagit physiquement avec Shibire, l'homologue de la dynamine chez la drosophile, ce qui suggère que le rôle joué par MyoID dans la détermination D/G pourrait dépendre d'un transport intracellulaire (cet aspect sera abordé dans la discussion section 1.3.1) [4].

Le laboratoire a montré conjointement à Hozumi et col. que les deux domaines IQ du cou sont essentiels pour que MyoID puisse exercer sa fonction D/G [4, 136]. Les domaines IQ des protéines de la superfamille des myosines sont des sites de liaison pour la calmoduline ou la chaîne légère de myosine. De même les domaines de liaison à l'actine et les sites de liaison à l'ATP sont requis pour la fonction D/G de MyoID [136]. La fonction de MyoID est requise au jour 6 à la transition L3-stade pupal (126-132 heures AEL) [4].

3.3.3.2 Abd-B et l'activation transcriptionnelle précoce des déterminants D/G

Nous avons récemment identifié le gène Hox *Abdominal-B* (*Abd-B*) comme un régulateur de la détermination D/G en amont de MyoID [137]. Ce rôle est distinct de sa fonction dans la spécification de l'axe antéro-postérieur. Par ailleurs notre équipe a montré que l'isoforme Abd-B^M est capable de se lier à des séquences régulatrices du gène *myoID* et de contrôler l'expression de MyoID dans l'organisateur D/G. De manière intéressante cette étude révèle que Abd-B^M contrôle également la voie sinistrale. Ainsi lorsque l'activité d'Abd-B est supprimée, il n'y a plus de brisure de symétrie et les mouches se développent

symétriquement. Par conséquent, cette étude montre que Abd-B contrôle l'évènement le plus précoce connu dans la détermination D/G de la drosophile [137]. Par ailleurs cette étude confirme que le déterminant dextral MyoID est dominant sur le déterminant sinistral [4, 137].

3.3.3.3 Rôle des jonctions adhérentes et de MyoIC en aval de MyoID

Une autre myosine non conventionnelle de type I appelée MyoIC est présente dans le génome de la drosophile. Sa structure est très similaire à celle de MyoID. La surexpression de MyoIC dans l'intestin embryonnaire induit un phénotype *situs inversus* comme dans le cas d'une perte de fonction de *myoID*. Ceci suggère un effet antagoniste de MyoIC sur MyoID.

Des travaux récents réalisés au laboratoire ont permis de préciser la fonction de MyoIC et des jonctions adhérentes [138]. Ainsi, nous avons montré que la DE-cadhérine interagit physiquement avec MyoID et est requise pour la détermination D/G [138]. Or nous avons précédemment montré que MyoID interagissait physiquement avec la β -caténine [4]. Petzoldt et col. montrent que la DE-cadhérine agit à la fois dans la voie dextrale et dans la voie sinistrale. L'ensemble de ces données suggère que suite au recrutement de MyoID aux jonctions adhérentes par la β -caténine, la DE-cadhérine a un double effet sur la détermination D/G : d'une part elle favorise l'activité de MyoID et d'autre part elle réprime l'activité anti-dextrale de MyoIC. Par conséquent, la DE-cadhérine sert de plateforme signalétique pour la détermination D/G.

D'autres travaux menés par Taniguchi et col. introduisent la notion de chiralité planaire des cellules (ou *planar cell-shape chirality*) pour expliquer comment les cellules épithéliales de l'*hindgut* présentent une chiralité cellulaire (dans le plan de l'épithélium) [139]. Cette chiralité planaire des cellules est impliquée dans la rotation directionnelle de l'*hindgut* embryonnaire. La DE-cadhérine, distribuée sur les bords de la cellule de manière asymétrique, est responsable de la génération de cette chiralité planaire.

Par conséquent, Taniguchi et col. montrent comme Petzoldt et col. que la DE-cadhérine agit en aval de MyoID pour contrôler la propagation de la brisure de symétrie et la morphogenèse asymétrique.

L'ensemble de ces travaux, chez la drosophile, renforce le modèle intracellulaire. En effet la brisure de symétrie initiale repose sur l'activité de MyoID qui induit une information directionnelle. Cette information doit être propagée à l'ensemble des cellules de l'organisateur D/G. Les mécanismes cellulaires permettant de transmettre le biais D/G au reste de l'architecture tissulaire sont peu connus. Les jonctions adhérentes semblent néanmoins jouer

le rôle de plateforme signalétique dans la transmission de l'information D/G entre les cellules exprimant MyoID et les cellules adjacentes.

3.3.4 Apoptose et rotation directionnelle du génitalia

L'expression de MyoID dans le segment A8 du disque génital est restreinte à deux rangées de cellules : l'une située dans le compartiment antérieur (A8a) et l'autre dans le compartiment postérieur (A8p) (Figure 15) [4, 134]. La rotation du génitalia commence 25 heures AFP et dure 12 à 15 heures [134]. A 25 heures AFP, le disque génital est organisé sous la forme d'anneaux concentriques : l'anneau A8a, l'anneau A8p et un grand disque central composé des tissus A9 et A10. Notre équipe a identifié deux domaines capables de réaliser un mouvement de rotation : un grand domaine postérieur comprenant les domaines A8p-A9-A10 et un domaine antérieur plus petit A8a. La rotation du génitalia d'un angle de 360° est issue d'un processus additif impliquant ces deux domaines. Chacun de ces domaines tourne d'un angle de 180° [134]. De manière intéressante, nous avons montré que la direction de rotation de chaque anneau est autonome et dépend de MyoID. Ainsi, l'inactivation spécifique de MyoID dans un domaine induit la rotation de l'anneau correspondant dans la direction opposée et par conséquent annule l'ensemble du mouvement. Enfin nous avons mis en évidence un mécanisme d'apoptose à la frontière entre les deux anneaux. Une mort cellulaire localisée est indispensable pour que les deux domaines puissent tourner. Une autre étude récente a montré que l'apoptose est également capable de contrôler la vitesse de rotation du génitalia chez le mâle [141]. Kuranaga et col. ont observé que cette apoptose coordonne le mouvement de l'anneau le plus externe ce qui induit l'accélération de la rotation du génitalia. Ces données permettent donc de faire le lien entre la détermination D/G et la rotation par étape du génitalia [134].

4-Asymétrie cérébrale

4.1 Latéralisation structurale et fonctionnelle du cerveau

Chez l'homme comme dans la majorité des espèces animales, le cerveau présente une organisation bilatérale. Néanmoins des asymétries structurales entre le côté droit et le côté gauche du système nerveux central d'un organisme peuvent être observées. Des asymétries anatomiques structurales sont ainsi retrouvées chez de nombreux vertébrés dont l'homme. L'asymétrie des noyaux habénulaires est par exemple une asymétrie fréquemment retrouvée chez divers espèces de vertébrés. La taille et/ou les lobations des habenules droite et gauche

sont différentes chez de nombreux poissons, amphibiens et reptiles [1]. Chez les invertébrés, à l'exception du corps asymétrique chez la drosophile et de certains neurones unilatéraux chez *C. elegans*, peu d'asymétries nerveuses anatomiques ont été rapportées [1].

Pour la réalisation d'une fonction sensorielle ou cognitive donnée, seul un des deux hémisphères cérébraux est mis à contribution ; c'est ce qu'on appelle la latéralisation fonctionnelle [140]. L'existence d'une asymétrie fonctionnelle entre hémisphère droit et hémisphère gauche est bien connue chez l'homme. L'établissement d'une carte fonctionnelle du cerveau a permis de montrer que de nombreuses fonctions cognitives (le langage, l'interaction et la communication avec l'environnement) dépendent d'une asymétrie cérébrale [1]. La mise en évidence d'asymétries D/G au niveau moléculaire permet d'établir des liens entre la latéralisation structurale et la latéralisation fonctionnelle du cerveau. En particulier Sun et col. [141] ont montré que certains gènes sont asymétriquement exprimés entre les deux hémisphères cérébraux chez l'homme. En outre, chez l'homme, les individus *situs inversus* présentent une inversion de la grande majorité des structures anatomiques latéralisées du cerveau. Ceci permet d'établir un lien entre asymétrie cérébrale structurale et asymétrie viscérale. En revanche, chez les individus *situs inversus*, la latéralisation des fonctions du langage, par exemple, n'est pas inversée. Certaines asymétries cérébrales fonctionnelles ne semblent donc pas corrélées avec l'asymétrie viscérale [142, 143].

4.2 Asymétrie D/G cérébrale chez le zébrafish

Le modèle du zébrafish a permis d'établir une corrélation entre la latéralisation neuro-anatomique et certains comportements latéralisés [144]. Chez le zébrafish, au stade larvaire, il est possible d'établir des corrélations entre certains comportements asymétriques et des asymétries neuroanatomiques observées dans le diencephalon épithalamique dorsal [140, 145]. L'hypothalamus du zébrafish est composé des noyaux habenulaires droit et gauche et du complexe pinéal adjacent consistant en deux noyaux photoreceptifs : l'épiphyse située en position médiane et la parapinéale du côté gauche [140]. Chez le zébrafish, l'habenula présente des asymétries neuroanatomiques et moléculaires marquées. L'asymétrie D/G anatomique dans l'hypothalamus est établie par étape selon une séquence de modules développementaux. Des interactions réciproques entre l'habenula gauche en développement et les cellules migrantes de la parapinéale permettent de coordonner la mise en place des différentes asymétries. Cette séquence d'évènements peut être résumée comme suit (discutée en détail dans [140]) :

1. Nodal permet l'établissement d'une asymétrie dans un ensemble de neurones habénulaires précoces. Cette action de Nodal pourrait aussi influencer légèrement la mise en place des asymétries habénulaires tardives.
2. Fgf8 induit la migration des cellules parapinéales en dehors de la ligne médiane. La signalisation dépendante de Nodal pourrait influencer le sens de migration des cellules parapinéales en donnant aux cellules parapinéales situées du côté gauche une aptitude accrue à répondre et à migrer en réponse au signal Fgf8. Ce mécanisme pourrait reposer sur une modulation de l'activité de Fgf8 dans l'environnement habénulaire.
3. La parapinéale est requise pour la spécification de l'habenula gauche. La parapinéale pourrait influencer la production de différents sous-types de neurones habénulaires en accélérant la neurogenèse habénulaire et/ou en spécifiant directement le caractère des neurones habénulaires. Ces deux rôles hypothétiques de la parapinéale pourraient impliquer une modulation de la signalisation Notch et/ou Wnt.

Chapitre 2 : La Kinésine-2, un moteur aux multiples facettes.

Les kinésines constituent une super-famille de moteurs microtubulaires impliqués dans une grande variété de processus biologiques chez les eucaryotes. Ces moteurs assurent le transport et le positionnement sub-cellulaires de cargos moléculaires en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Le génome des cellules eucaryotes code pour un grand nombre de kinésines (plus de 40 chez l'homme) organisées en plus de 14 familles parmi lesquels on trouve la Kinésine-2. La Kinésine-2 prototypique a été purifiée pour la première fois chez l'oursin sous la forme d'un complexe hétérotrimérique constitué de deux sous-unités motrices différentes associées à une sous-unité adaptatrice. Néanmoins la Kinésine-2 peut exister sous la forme de plusieurs oligomères impliqués dans une grande variété de fonctions biologiques ciliaires ou intracellulaires [146].

1-Structure et états oligomériques des sous-unités motrices de la Kinésine-2.

1.1 Composition du complexe moteur hétérotrimérique

Le complexe moteur hétérotrimérique Kinésine-2 a été identifié chez de nombreux organismes comme les algues, les nématodes, les insectes, les échinodermes et les vertébrés [146]. Les séquences protéiques des sous-unités motrices Kinésine-2 α (Kin-2 α) et Kinésine-2 β (Kin-2 β) présentent une forte homologie entre espèces. De plus il existe des similitudes entre le domaine moteur amino-terminal (N-term) de ces sous-unités motrices et le domaine moteur de la kinésine I au niveau de leur structure secondaire (consistant en 8 feuillets β et 6 hélices α) [147]. Les deux sous-unités Kin-2 α et Kin-2 β sont liées entre elles par leur extrémité carboxy-terminale (C-term) au niveau du domaine *tige*. Celui-ci présente des sur-enroulements (*coiled-coil*) des domaines en hélice α . Cette conformation conduit à la formation de l'hétérodimère 2 α /2 β qui s'associe à la sous-unité adaptatrice KAP [148] (Figure 17A). Chez les vertébrés, l'oligomérisation combinée de différentes sous unités motrices de la Kinésine-2 peut conduire à la formation de deux complexes moteurs hétérotrimériques différents : l'un constitué des sous unités KIF3A/3B/KAP3 et l'autre formé de KIF3A/3C/KAP3. Ces deux complexes pourraient avoir des fonctions différentes [146]. Chez la drosophile il a été rapporté que la Kinésine-2 hétérotrimérique est constituée des deux sous-unités motrices KLP64D et KLP68D (homologues respectifs de KIF3A et KIF3B) et la sous-unité adaptatrice DmKAP [149, 150] (Figure 17B). Par ailleurs, l'analyse du génome de

la drosophile a permis d'identifier DmKif3C (CG17461; NP_661939.4) comme un homologue de Klp64D et Klp68D [151]. Cependant sa fonction reste encore inconnue [152] et la formation d'un complexe Kinésine-2 homodimérique n'a jamais été rapportée chez la drosophile.

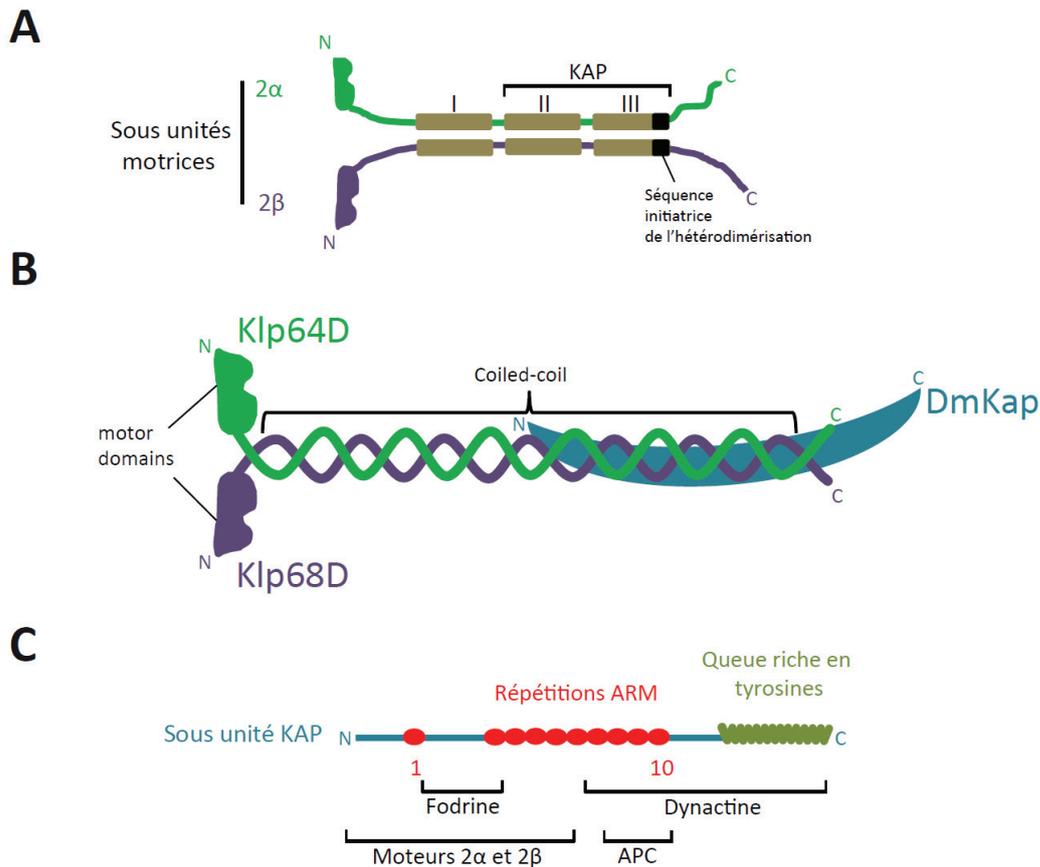


Figure 17 Structure, assemblage et organisation des domaines des sous-unités de la Kinésine-2.

(A) Assemblage des moteurs de la Kinésine-2. Le domaine *tige* des sous-unités kin-2 α et kin-2 β contient trois régions *coil-coiled* surenroulées. L'établissement de liaisons hydrophobes et de ponts salins favorisent l'hétéro-appariement. Une origine de nucléation présente sur les deux sous-unités motrices est capable de déclencher cet hétéro-appariement. (B) Chez la drosophile les deux sous-unités motrices Klp64D et Klp68D s'associent entre elles et se lient à la sous-unité adaptatrice DmKAP. L'extrémité N-term de DmKAP s'associe à la moitié C-term de la tige hétérodimérique laissant libre le domaine ARD, et le domaine de liaison à la dynactine (plus précisément le domaine de liaison à la sous-unité p150 de la dynactine) portés par la moitié C-term de KAP. (C) La sous-unité KAP de la Kinésine-2 hétérotrimérique contient des domaines ARD, une queue riche en tyrosine ainsi que des sites de fixation pour la fodrine, la dynactine, APC et les sous-unités motrices de la Kinésine-2. Figures A et C modifiées de [146].

1.2 Régulation et stabilisation de l'oligomérisation

L'étude de l'oligomérisation de la Kinésine-2 hétérotrimérique a permis de montrer que deux segments (sur-enroulements II et III) du domaine *tige* à l'extrémité C-term de chaque sous-unité motrice possèdent des résidus de charges opposées et complémentaires favorisant l'hétérodimérisation (Figure 17A). Par ailleurs, les segments chargés de manière complémentaire à l'extrémité N-term pourraient également contribuer à cette hétérodimérisation [146]. De plus il a été montré, chez *C. elegans*, que l'hétérodimérisation est déclenchée grâce à une origine de nucléation à l'extrémité C-term de la *tige*. Cette origine de nucléation constituée d'une courte séquence d'acides aminés est indispensable à l'hétérodimérisation des deux sous-unités motrices [153]. En outre, cette hétérodimérisation pourrait être également requise pour la fixation de la sous-unité adaptatrice KAP [154].

La manière dont KAP s'apparie à l'hétérodimère reste encore mal déterminée. Deux types d'associations ont été rapportés : des observations en microscopie électronique chez l'oursin et la souris suggèrent que KAP pourrait s'associer avec l'extrémité C-term de l'hétérodimère [155, 156]. En revanche, chez la drosophile, il a été suggéré que la région N-term de KAP se lie le long des régions surenroulées à l'extrémité C-term des sous-unités motrices et pourrait ainsi stabiliser la *tige* hétérodimérique [149] (figure 17B). Cette association crée un surenroulement stable à l'extrémité C-term de la tige en permettant l'établissement de liaisons ioniques et hydrophobes. De plus les segments situés en N-term restent relativement flexibles et ont tendance à se dénouer de manière réversible ce qui pourrait contribuer à la motilité de la Kinésine-2 [146, 150].

2-Evolution et conservation de la Kinésine-2.

La formation de cet hétérotrimère moteur commence à être mieux connue. Cependant on peut se demander :

- Quelle relation évolutive et phylogénique existe-t-il entre les différents complexes Kinésine-2 dans les différents règnes du vivant ?
- Comment la Kinésine-2 a évolué d'un point de vue fonctionnel entre les vertébrés et les invertébrés (cet aspect sera également développé dans la discussion) ?

Les membres de la famille Kinésine-2 sont trouvés chez les organismes eucaryotes ciliés actuels comme les chytrides ciliés mais pas chez les organismes non ciliés comme la levure

bourgeonnante [146]. Selon M Scholey, ceci suggère que les moteurs Kinésine-2 ont été maintenus au cours de l'évolution pour, en premier lieu, servir au transport intra-flagellaire et l'assemblage de l'axonème. Ils peuvent également exercer des fonctions cytoplasmiques variées chez ces organismes [146, 157, 158].

La diversité des homologues de la Kinésine-2 chez de nombreux eucaryotes est due à de multiples duplications des gènes codant pour chaque sous-unité de la Kinésine-2 dans chaque lignée eucaryotique. Ceci permet soit la formation du complexe hétérotrimérique kin-2 α /kin-2 β /KAP ou d'un complexe formé par dimérisation de la sous-unité kin-2 γ [146]. Le complexe hétérotrimérique Kinésine-2 a évolué à plusieurs reprises au sein de plusieurs lignées eucaryotes probablement à partir d'un complexe homodimérique ancestral. L'architecture hétérotrimérique semble par conséquent conférer un avantage fonctionnel important.

Plusieurs analyses phylogéniques des domaines moteurs des sous-unités kinésines chez différents organismes modèles [158, 159] ont été réalisées (Figure 18). Il en ressort que Klp64D et Hs KIF3A (homologue humain) sont très proches en termes de séquence alors que Klp68D et son homologue humain sont plus éloignés. D'autre part DmKif3C (drosophile) est beaucoup plus proche de Hs KIF17 (à l'origine de la formation de l'homodimère Kinésine-2) que de Hs KIF3C [158] ce qui plaide plutôt vers une éventuelle homodimérisation de DmKif3C plutôt qu'une association à Klp64D comme l'ont suggérée Jana et col. [152]. Par conséquent, chez la drosophile, à la différence des vertébrés, seul un complexe hétérotrimérique constitué de Klp64D/Klp68D/Kap3 serait capable de se former. Les fonctions cellulaires exercées pas ce complexe moteur sont encore peu connues.

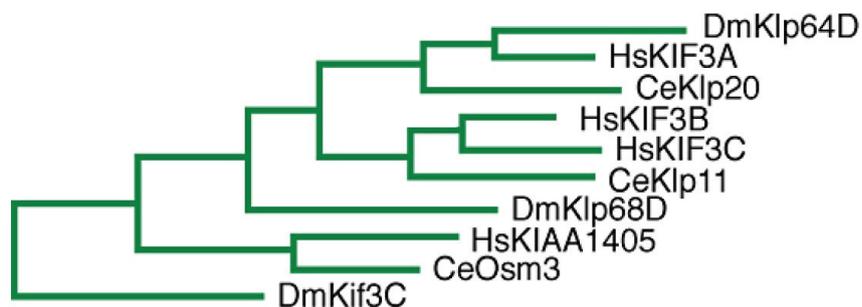


Figure 18. Arbre phylogénétique des sous-unités de la Kinésine-2

Cet arbre a été construit par la méthode de parcimonie à partir de l'alignement des séquences des domaines moteurs des sous-unités de la Kinésine-2. Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*. Extrait de [159]

3-Motilité et exécution du mouvement

On peut dès lors se demander quel avantage évolutif confère la combinaison de deux sous-unités motrices distinctes pour former une holoenzyme Kinésine-2 hétérotrimérique. KIF3A, -3B et -3C présentent des différences de séquence protéique dans leurs domaines de liaison aux microtubules et leur domaine *neck-linker* (connectant la tige à la tête motrice globulaire). Ces différences sont conservées entre les différents organismes modèles étudiés. Cependant aucun lien n'a pu être établi entre ces différences et la motilité de la Kinésine-2 hétérotrimérique [160].

De manière intéressante, il a été montré que la Kinésine-2 hétérotrimérique est capable d'exercer une force de torsion sur le microtubule [161]. Brunnbauer et col. ont, en particulier, démontré que c'est la région *cou* des deux sous-unités motrices qui contrôle la génération de cette torsion permettant au complexe Kinésine-2 (excepté pour le complexe MmKIF3A/3B) d'avancer le long du microtubule en tournant autour de celui-ci vers la gauche (démonstré pour les complexes Kinésine-2: KLP3A/3B, CeKLP11/20 et SpKRP85/95) [162]. Il a été suggéré que cette progression spiralée sinistrale permettrait au moteur de contourner des obstacles qui se dresseraient sur sa route lors du transport.

Une autre étude montre que l'une des deux sous-unités motrices de la Kinésine-2 hétérotrimérique est non processive ; elle est cependant capable de le devenir suite à son appariement avec l'autre sous-unité motrice [154]. Seul cet hétérodimère kin-2 α /2 β est capable de s'associer à la sous-unité KAP [154]. Par conséquent, ces données nous éclairent sur la raison de cette hétérodimérisation et sur le rôle important joué par la sous-unité KAP.

Les complexes Kinésine-2 homodimériques et hétérotrimériques sont rapides, processifs (c'est-à-dire capables de se mouvoir le long d'un microtubule sur une longue distance sans s'en détacher) et se dirigent vers l'extrémité + des microtubules. La Kinésine-2 hétérotrimérique génère une force similaire à celle développée par la kin-1 (~ 5 pN). En revanche, si on compare la Kinésine-2 hétérotrimérique à la Kinésine-2 homodimérique, on constate que l'hétérotrimère est plus lent, moins processif et a tendance à se détacher plus facilement de son rail microtubulaire [146]. Ces propriétés influencent la fonction de ces complexes [163]. Ainsi, les propriétés motiles *in vitro* des moteurs Kinésine-2 homodimériques et hétérotrimériques sont en général cohérentes avec les fonctions de transport observées *in vivo* [146].

4-Fonctions cellulaires de la Kinésine-2 hétérotrimérique.

4.1 Fonctions ciliaires

4.1.1 *Transport intraflagellaire et ciliogenèse*

Comme nous l'avons abordé précédemment, la Kinésine-2 est requise pour la ciliogenèse. La Kinésine-2 est ainsi impliquée dans le transport intra-flagellaire antérograde de complexes multiprotéiques. La Kinésine-2 assure donc l'acheminement des précurseurs de l'axonème au niveau de leur site d'incorporation à l'extrémité + [164] et le transport des complexes de signalisation associés à la membrane [146, 165]. Ce complexe hétérotrimérique est retrouvé impliqué dans le transport intraflagellaire antérograde chez des organismes aussi différents que *Clamydomonas* [146, 166] ou *C elegans* [146, 167].

Chez l'oursin, l'inhibition de la Kinésine-2 lors du développement de l'embryon, empêche l'assemblage des axonèmes des cils motiles. Néanmoins, l'assemblage de cils non motiles, courts et possédant des nodules à leur extrémité est maintenu probablement grâce à la Kinésine-2 homodimérique [146, 168].

Chez la souris en dehors de son rôle dans le transport intraflagellaire, la Kinésine-2 est aussi impliquée dans l'organisation correcte des appendices subdistaux du centriole qui forme le corps basal du cil [169].

Enfin, chez la drosophile, la Kinésine-2 est requise pour l'assemblage des cils exprimés à la surface des neurones des récepteurs olfactifs de l'antenne [152]. Enfin, il a été montré sur des cellules de mammifère en culture que le transport du complexe PAR par la Kinésine-2 pourrait contribuer à la biogenèse du domaine apical où le cil primaire est assemblé [170, 171].

4.1.2 *Rôle dans la morphogenèse et la viabilité des cellules photoréceptrices*

Le rôle de la Kinésine-2 dans l'assemblage et la maintenance des cils sensoriels non-motiles est conservé aussi bien chez les invertébrés (notamment *C elegans* [168] et la drosophile [172]) que chez les vertébrés. Chez ces derniers, le segment externe des photorécepteurs est un cil sensoriel élaboré qui contient une grande quantité de protéines appelées opsines capables de réagir à l'énergie lumineuse. Ces protéines sont incluses dans la membrane des disques des cellules photoréceptrices de la rétine. Elles doivent continuellement être acheminées par un transport rapide le long de l'axonème depuis le segment interne vers le site de la morphogenèse de la membrane du disque dans le segment

externe [173]. Le fait que la Kinésine-2 assure ce transport dans les deux types de photorécepteurs rétiniens, cônes et bâtonnets, est encore débattu. Néanmoins les données disponibles à la fois chez les rongeurs et chez le zébrafish montrent que la Kinésine-2 joue un rôle important dans le transport de l'opsine le long de l'axonème [174-177] et la morphogénèse des photorécepteurs [178].

De plus, la Kinésine-2 est indispensable à la viabilité des cellules photoréceptrices de l'œil chez la souris [176, 179] comme chez la drosophile [172].

4.2 Fonctions non ciliaires

4.2.1 Transport axonal et cytoplasmique d'organelles

4.2.1.1 Dans les cellules neuronales

Chez les rongeurs, le complexe KIF3A/3B/KAP3 est impliqué dans le transport rapide ($\sim 0,5\mu\text{m/s}$) de vésicules associées à la fodrine le long de l'axone. Ce transport participe à la croissance des neurites [180].

Chez la drosophile, l'hétérotrimère, Klp64/68D/KAP est exprimé dans les neurones cholinergiques. Il y assure le transport de la choline acetyltransférase (ChAT) vers le compartiment présynaptique où elle est requise pour la synthèse d'acétylcholine et la neurotransmission [181]. Une autre étude a révélé que la ChAT est transportée sous une forme soluble au lieu d'être incluse dans une vésicule ou dans un complexe protéique. En revanche, ce transport axonal est lent ($\sim 0,01\mu\text{m/s}$). Il a été proposé que la queue de la sous-unité Klp64D puisse interagir transitoirement avec ChAT pour assurer son déplacement dans la synapse [182].

4.2.1.2 Transport cytoplasmique de vésicules et d'organelles

Dans les cellules non neuronales, la Kinésine-2 est également impliquée dans le transport bidirectionnel de vésicules et d'organelles.

Ce transport est associé aux voies sécrétoires et endocytiques. Dans les cellules de vertébrés en culture, cet hétérotrimère assure le transport de vésicules recouvertes d'un manteau de coatomère de type 1 (COP-1) entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique [183, 184]. Il assure également le transport de vésicules entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique [185] ainsi que la mobilité des endosomes et des lysosomes tardifs vers l'extrémité + des microtubules [186].

En revanche dans le muscle en développement, la Kinésine-2 n'est pas impliquée dans le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique mais se localise au niveau du réticulum sarcoplasmique et des tubules transverses [187].

En outre, la Kinésine-2 est également impliquée dans la dispersion des mélanosomes en assurant leur mouvement antérograde le long des microtubules [188] (ces mélanosomes sont des organelles pigmentées contenues par des cellules spécialisées, les mélanophores).

4.2.2 Transport intracellulaire du VIH

Une étude récente a montré que la Kinésine-2 est impliquée dans le transport intracellulaire du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Gaudin et col. ont montré que la Kinésine-2 transporte des compartiments cellulaires contenant le VIH dans des macrophages humains infectés, contribuant ainsi au relargage et à la propagation du virus [189]. Cependant les stades précoces de l'infection des macrophages de même que le cycle de vie du VIH dans les cellules T ne sont pas affectés par la déplétion de KIF3A. Les protéines se liant à KIF3A et impliquées dans le cycle de vie du virus dans les macrophages sont pour le moment inconnues [146].

4.2.3 Mitose et cytokinèse

Pour le moment les données disponibles ne permettent pas de généraliser sur un rôle conservé de la Kinésine-2 dans la mitose et la division cellulaire. La Kinésine-2 contribue, grâce à son rôle dans l'assemblage des cils, à la cytokinèse chez *Tetrahymena* [190]. Les cils contribuent dans ce cas aux forces mécaniques permettant la séparation des deux cellules filles.

Chez l'oursin, bien que la Kinésine-2 soit localisée au niveau du fuseau mitotique, son implication dans la cytokinèse n'a pu être démontrée [191].

Dans les cellules de mammifères, l'expression ectopique de la queue de KIF3B ou la déplétion de cette sous-unité motrice par ARNi interfère avec le transport assuré par la Kinésine-2 vers le fuseau central de protéines régulatrices de l'anneau contractile et/ou de vésicules impliquées dans l'extension de la membrane [192, 193]. Il en résulte des défauts de cytokinèse.

4.2.4 Transport des ARN

Une étude menée chez le xénope montre que la Kinésine-2 est impliquée dans le transport de l'ARNm Vg1 au pôle végétatif durant l'ovogenèse [194]. Ce transport de

l'ARNm Vg1, requis pour la spécification de l'endoderme et du mésoderme embryonnaires, implique en fait une coopération entre la Kinésine-2 hétérotrimérique et la kinésine-1 [195]. Ces deux complexes moteurs collaborent donc ensemble pour transporter cet ARNm vers l'extrémité + du microtubule afin de le délivrer au niveau du cytoplasme cortical du pôle végétatif. Ceci constitue un exemple intéressant de transport collaboratif impliquant la Kinésine-2 et un autre moteur au cours du développement embryonnaire.

4.2.5 Polarisation des cellules

4.2.5.1 Polarité neuronale

Plusieurs études ont révélé l'implication de la Kinésine-2 dans des mécanismes de polarisation cellulaire. En particulier, la Kinésine-2 est impliquée dans l'établissement de la polarité neuronale en assurant le transport spécifique du complexe Par (impliqué dans la polarisation apico-basale) et d'APC. Ce transport s'effectue vers l'extrémité du neurite immature qui donne naissance à l'axone [196, 197].

Chez la drosophile, l'utilisation de RNAi ciblant *kfp68D*, *kfp64D* et *DmKAP* a permis de montrer que la Kinésine-2 contribue à la polarité neuronale [198]. En outre, Mattie et col. ont montré *in vitro* (test double hybride chez la levure) que :

- La sous-unité DmKAP est potentiellement capable d'interagir avec le domaine ARD (*Armadillo Rich Domain*) de dAPC1 mais pas de dAPC2.
- dAPC1 et dAPC2 sont capables d'interagir ensemble via leurs domaines ARD
- L'extrémité C-term de dAPC1 est capable d'interagir avec l'extrémité C-term d'EB1

Même si ces interactions doivent être confirmées par des méthodes biochimiques, ces résultats placent, chez la drosophile, dAPC1 au centre d'un réseau qui lie la Kinésine-2 à EB1. Ces données suggèrent donc chez la drosophile, que la Kinésine-2, APC et EB1 sont requis pour maintenir la polarité des microtubules dans les dendrites [198].

4.2.5.1 Polarité et migration cellulaire

Une étude réalisée chez la drosophile suggère un rôle pour la Kinésine-2 dans les cellules non neuronales. Cette étude portant sur la morphogenèse des photorécepteurs révèle ainsi que Kfp64D assure la localisation sub-cellulaire correcte de Par-3 et de la β -caténine au niveau des jonctions adhérentes des cellules photoréceptrices [172]. De plus cette étude et les travaux de Ray et col. [181] montrent que certains phénotypes mutants de *kfp64D* peuvent être sauvés par l'expression de l'orthologue murin KIF3A, suggérant une conservation fonctionnelle entre KIF3A et Kfp64D.

Il a également été montré que KIF3A régule la polarité planaire au niveau des cellules auditives ciliées des vertébrés grâce à des mécanismes ciliaires et non ciliaires [199]. Cette étude montre que les cellules auditives mutantes pour KIF3A présentent une position anormale des corps basaux par rapport à l'axe apico-basal et à la polarité planaire. De manière intéressante, cette étude révèle également une fonction non ciliaire de KIF3A qui régule l'activité corticale de p21-activated kinase (PAK) qui à son tour contrôle le positionnement du corps basal dans les cellules auditives. Sipe et col. montrent ainsi que KIF3A est un composant important de la polarité intrinsèque des cellules auditives.

La Kinésine-2 est également impliquée dans la mise en place de la polarité avant/arrière lors de la migration cellulaire [200, 201]. La sous unité KAP3 pourrait ainsi se lier à APC et à la nucléoporine Nup358 pour les transporter à l'extrémité en croissance des microtubules (au niveau du cortex) localisée au niveau du front de migration. Une autre étude récente menée sur des cellules MDCK corrobore ces observations et montre que KIF3A contrôle le comportement des microtubules (dynamique et directionnalité) au niveau du front de migration ce qui influence la migration cellulaire et la morphogenèse épithéliale [202].

4.2.6 Adhésion cellule-cellule

L'invalidation conditionnelle de KAP3, dans les précurseurs neuronaux embryonnaires, affecte le positionnement de la N-cadhérine au niveau des sites d'adhésion cellule-cellule et donc l'adhésion entre les cellules progénitrices neurales. Par conséquent cette étude suggère que la Kinésine-2 est impliquée dans l'organisation du neuroépithélium en développement. Ces travaux renforcent l'hypothèse selon laquelle la Kinésine-2 assure le transport post-golgi de vésicules contenant la cadhérine vers la surface cellulaire en vue d'intervenir dans l'adhésion entre cellules [203]. Une autre étude sur des cellules en culture, révèle que la Kinésine-2 assure le transport de vésicules de 60-nm contenant la cadhérine desmosomale DSC2 depuis l'appareil de Golgi jusqu'aux sites d'adhésion cellule-cellule au niveau de la membrane plasmique, alors que kin-1 transporte des vésicules de 200-nm contenant la cadhérine desmosomale DSG1 [185]. Cette régulation différentielle des deux moteurs contribue au mécanisme de modulation de l'adhérence entre cellules lors de la morphogenèse tissulaire.

4.3 Fonctions ciliaires et non ciliaires de la Kinésine-2 au cours du développement.

Comme nous l'avons abordé précédemment (voir section 2.1.1.1), la Kinésine-2 joue un rôle prépondérant lors de l'embryogenèse car il participe à l'assemblage des cils du nœud

indispensable à la détermination D/G et intervient dans plusieurs voies de signalisations dépendantes de ces cils [146]. Par exemple KIF3A joue un rôle dans la signalisation de la voie Hedgehog dépendante des cils qui contrôle le développement du squelette des vertébrés [204]. Cependant dans les études fonctionnelles portant sur la Kinésine-2, il est souvent difficile de déterminer si les défauts induits par l'invalidation de la Kinésine-2 au cours du développement embryonnaire sont uniquement dus à des défauts de transport intraflagellaire et de ciliogenèse ou s'il s'agit de défauts dus à une absence de transport intracellulaire (par exemple dans le transport extraciliaire contrôlant l'adhésion ou la polarité cellulaire). L'étude de Corbit et col. apporte des éléments pour comprendre cette dualité fonctionnelle chez les vertébrés [205]. Ils ont montré que la Kinésine-2 limite la signalisation Wnt de deux manières :

1. en induisant l'inhibition (indépendante des cils) de la phosphorylation de Dvl dans le cytoplasme
2. en assurant le transport intraflagellaire permettant l'assemblage du cil primaire qui à son tour restreint la signalisation Wnt par une voie de signalisation dépendant du cil.

Cette étude, comme celle de Sipe et col. sur la polarité des cellules auditives ciliées [199] montre, chez les vertébrés, qu'il peut y avoir coexistence dans les mêmes cellules et pour un même processus, d'une fonction dépendante des cils et d'une contribution extraciliaire de la Kinésine-2. Une contribution non ciliaire de la Kinésine-2 dans la détermination D/G chez les vertébrés a d'ailleurs été suggérée par les travaux de Qiu et col. [62]. Cependant aucun mécanisme intracellulaire impliquant la Kinésine-2 n'a pu être mis en évidence.

5-Fonctions de la Kinésine-2 homodimérique

Comme la Kinésine-2 hétérotrimérique, la Kinésine-2 homodimérique présente à la fois des fonctions ciliaires et non ciliaires. La Kinésine-2 homodimérique se forme par oligomérisation de deux sous-unités motrices kin-2 γ . Par conséquent, la Kinésine-2 homodimérique est structurellement différente par rapport à la Kinésine-2 hétérotrimérique. Elle a été retrouvée impliquée dans la ciliogenèse, le développement des photorécepteurs et le transport de molécules signalétiques dans le cil primaire. D'autre part elle assure le transport dendritique, et intervient dans la polarité épithéliale. Enfin, un rôle dans le fonctionnement cérébral a également été mis en évidence (l'ensemble de ces fonctions sont exposées en détail dans l'excellente revue de Scholey et col. [146]).

6-Régulation du transport et coopération avec d'autres moteurs

6.1 Rôle de la sous-unité KAP dans la régulation du transport

6.1.1 Structure et conformation de la sous-unité KAP

Les analyses de séquences couplées à des observations en microscopie électronique ont permis de montrer, chez l'oursin, que la sous-unité KAP est une protéine de 828 résidus, globulaires et constituée d'hélices α . Elle possède des domaines d'interaction protéique ARD, pour *armadillo repeat domain* et son extrémité C-term est riche en Tyrosines [146] (Figure 17C). Chez les rongeurs, KAP3 présente 65% d'homologie avec la protéine KAP3 des échinodermes et existe sous la forme de deux isoformes. En outre il a été montré notamment chez la drosophile, que Kap3 se lie préférentiellement à l'extrémité C-term de l'hétérodimère Klp64D/Klp68D pour le stabiliser [149, 154].

6.1.2 Fonctions biologiques de KAP

La fonction cellulaire de la sous-unité KAP est encore mal connue cependant cette sous-unité apparaît essentielle à l'activité de la Kinésine-2 chez les mammifères [146]. L'une des fonctions possibles de KAP est de servir de protéine adaptatrice pour la fixation et le transport de cargos moléculaires. Le fait qu'elle se fixe à la fois à des vésicules de transport contenant la fodrine [180] ou à APC [200] renforce cette hypothèse.

Comme les sous-unités accessoires appartenant à d'autres complexes moteurs (par exemple la chaîne légère de myosine) jouent un rôle régulateur, il a été proposé que KAP pourrait également réguler l'activité du complexe hétérotrimérique Kinésine-2. KAP est ainsi capable de se lier à des protéines impliquées dans la signalisation dépendante des protéines G, à des Src tyrosine kinases [206], à des phosphatases [207] et à la dynactine [208]. Chez la drosophile, il a également été montré que Kap3 est impliquée dans la séparation des follicules durant l'ovogenèse [151]. KAP contribuerait ainsi au transport de composants impliqués dans la signalisation entre les cellules germinales et les cellules somatiques.

6.2 Coopération fonctionnelle entre la Kinésine-2 et d'autres moteurs.

Si la Kinésine-2 est capable de s'associer à des cargos moléculaires, elle est aussi capable de coopérer avec d'autres moteurs pour créer des réseaux de transport dans la cellule. La Kinésine-2 collabore avec la dynéine rétrograde pour générer un transport bidirectionnel intraciliaire le long des microtubules. D'autres exemples d'interactions fonctionnelles ont été

mis en évidence : on peut citer la coopération entre la Kinésine-2 et la kinésine-1 dans le transport de l'ARN et l'assemblage des desmosomes ou la collaboration entre la Kinésine-2 et la myosine-VIIA dans le transport associé aux photorécepteurs [185, 195, 209].

J'ai choisi de développer plus particulièrement la coopération de la Kinésine-2 hétérotrimérique avec la dynéine cytoplasmique et la myosin-V pour le transport et l'ancrage des mélanosomes dans les mélanophores du xénope (Figure 19) [146]. Ce processus est contrôlé par un réseau de molécules signalétiques étroitement liées à la surface de l'organelle. Parmi ces molécules on peut citer les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} et l'AMPc, Rab32 et la MAP kinase [146]. La dynactine qui constitue le cofacteur de la dynéine se lie à fois à la dynéine et à la Kinésine-2 hétérotrimérique (via sa sous-unité KAP) à la surface de l'organelle.[208]. L'hormone stimulant les mélanocytes induit le transport antérograde des mélanosomes assuré par la Kinésine-2 hétérotrimérique le long des microtubules. Ceci induit leur dispersion à travers la cellule. En revanche la mélatonine induit leur transport rétrograde dépendant de la dynéine et l'agrégation des mélanosomes [146]. Par ailleurs les moteurs microtubulaires associés aux mélanosomes du xénope ne rentrent pas en compétition l'un avec l'autre. Leur action est coordonnée probablement via la dynactine pour agir lorsqu'ils sont requis. La transition entre motilité antérograde et motilité rétrograde implique une modification du nombre de moteurs liés à l'organelle et engagés activement dans le transport [208, 210]. De plus pendant le processus de dispersion, les mélanosomes qui sont transportés le long des microtubules par la Kinésine-2 hétérotrimérique semblent être décrochés de leur rail microtubulaire par la myosine-V. Les mélanosomes sont alors transportés le long des filaments d'actine qui déterminent la distribution finale de ces organelles [146].

7-Maladies associées aux moteurs Kinésine-2

On peut distinguer les maladies liées à la fonction ciliaire de la Kinésine-2 de celles qui relèvent de la fonction de transport cytoplasmique du complexe. Les maladies associées à la Kinésine-2 les mieux documentées sont les différentes ciliopathies dues à des défauts de transport intraflagellaire et de ciliogenèse. Le tableau clinique associé à ces ciliopathies est très varié; on peut citer : le *situs inversus*, l'hydrocéphalie, l'anosmie, le retard mental, la polydactylie, l'obésité, l'infertilité, les maladies respiratoires, les troubles de la vue et la polykystose rénale [146, 211]. En outre KIF3A exerce un rôle ciliaire dans l'initiation et la progression du médulloblastome [212]. Cependant d'autres maladies sont associées aux mécanismes de transports intracellulaires assurés par la Kinésine-2 (qui n'ont pas de lien

direct avec le transport intraflagellaire ou les cils). Il a en effet été rapporté que la Kinésine-2 est impliquée dans la migration des cellules de cancer du sein [213], le transport et la propagation du HIV [189] et enfin le transport du récepteur au glutamate lié à la schizophrénie [214].

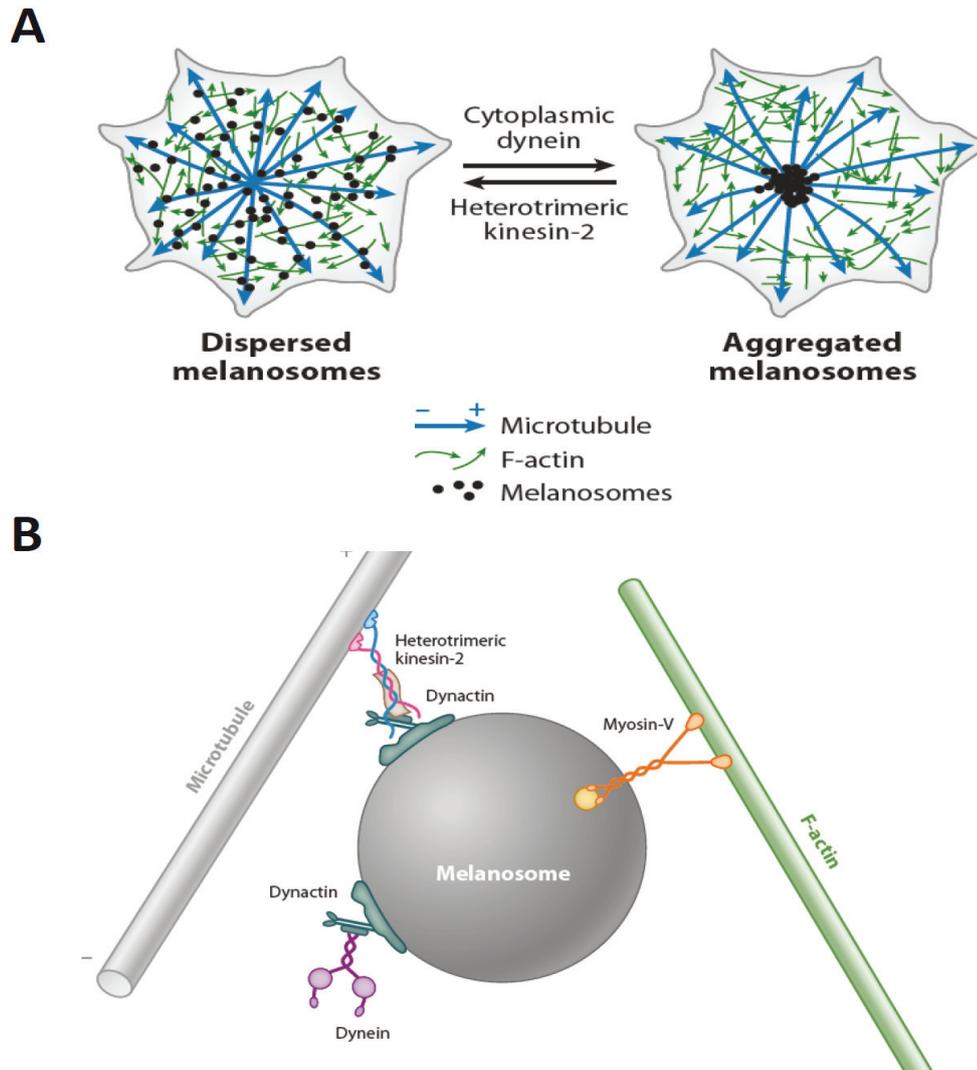


Figure 19. Transport des mélanosomes impliquant la Kinésine-2 hétérotrimérique.

(A) Dans les cellules pigmentaires des vertébrés inférieurs, la Kinésine-2 hétérotrimérique assure le transport antérograde le long des microtubules de mélanosomes contenant les pigments, ce qui conduit à leur dispersion et à leur ancrage aux filaments de F actine dans la cellule. La dynéine cytoplasmique assure le transport rétrograde des mélanosomes le long des microtubules ce qui mène à leur agrégation. (B) Le transport et les positionnements des mélanosomes chez le xénope impliquent une collaboration entre la Kinésine-2 hétérotrimérique, la myosine-V et la dynéine cytoplasmique. Extrait de [146]

Conclusion

Plusieurs mécanismes contribuent à la génération de l'axe D/G chez les vertébrés. Ainsi, les mécanismes précoces reposent sur la chiralité du cytosquelette et entrent en jeu au cours des premiers clivages. Des mécanismes plus tardifs impliquant notamment la rotation des cils qui génèrent le flux nodal lors de la gastrulation sont également mis en jeu. Le moteur microtubulaire Kinésine-2 joue un rôle important dans l'assemblage des cils du nœud et donc dans la détermination D/G chez la souris.

Chez les invertébrés la détermination D/G dépend du cytosquelette d'actine et des moteurs associés. Plus particulièrement, chez la drosophile, MyoID contrôle l'orientation dextrale des organes tels que le génitalia, l'intestin ou les testicules. Les mécanismes cellulaires reposant sur l'activité de MyoID pour créer le premier biais D/G sont encore mal connus. Les objectifs de ma thèse étaient donc :

- d'identifier de nouveaux partenaires fonctionnels de MyoID par la réalisation d'un crible génétique modificateur.
- d'étudier les mécanismes cellulaires à l'origine de la brisure de symétrie et notamment l'implication du moteur microtubulaire Kinésine-2 dans la détermination D/G.
- d'examiner les mécanismes permettant de propager l'information directionnelle induite par MyoID à l'ensemble des cellules de l'organisateur D/G.

Deuxième partie : Matériel et méthodes

1. Références des lignées utilisées dans cette étude.

| Mutant | Chr | Provenance | Stock |
|--|--------|--------------------------------|----------------|
| <i>myoID</i> ^{k2} | 2 | Labo Noselli (mutant nul) | |
| <i>myoID</i> ^{k1} | 2 | Labo Noselli (mutant nul) | |
| <i>lost</i> ^{c02107} | 3 | Exelisis Harvard | |
| <i>Df(3L)klp64D</i> ^{A8.n123} | 3 | Bloomington | #5674 |
| <i>klp68D</i> ^{EY00199} | 3 | Bloomington | #20090 |
| <i>klp68D</i> ^{KG03849} | 3 | Bloomington | #13511 |
| <i>khc</i> ²⁷ | 2 | Labo Saxton | |
| <i>apc2</i> ³³ | 3 | Labo Ahmed (allèle hypomorphe) | |
| <i>apc1</i> ^{Q8} | 3 | Bloomington | #7211 |
| <i>apc1</i> ^{Q8} , <i>apc2</i> ³³ | 3 | Labo Ahmed (allèle hypomorphe) | |
| Pilotes Gal4 | Chr | Provenance | Stock |
| <i>ptc::Gal4</i> | 2 | Labo Perrimon | |
| <i>Abd-B::Gal4, UAS::Dicer2</i> | 3 | Labo Noselli | |
| <i>myoID::Gal4, UAS::Dicer2</i> | 2 | Labo Noselli | |
| <i>myoID::Gal4; Abd-B::Gal4, UAS::Dicer2</i> | 2 et 3 | Labo Noselli | |
| <i>Gal80^{ts}, myoID::Gal4; Abd-B::Gal4, UAS::Dicer2</i> | 2 et 3 | Labo Noselli | |
| <i>tsh::Gal4</i> | 2 | Bloomington | #3040 |
| <i>byn::Gal4</i> | 3 | Labo Matsuno | |
| <i>byn::Gal4, UAS::Dicer2</i> | 3 | Labo Noselli | |
| <i>byn::Gal4, UAS::PH-PLC γ-GFP</i> | 3 | Labo Noselli | |
| RNAi | Chr | Provenance | Tranformant ID |
| <i>klp64D</i> ^{RNAi} (GD) | 2 | VDRC | #45373 |
| <i>klp68D</i> ^{RNAi} (GD) | 2 | VDRC | #27944 |
| <i>klp68D</i> ^{RNAi} (KK) | 2 | VDRC | #101058 |
| <i>kap3</i> ^{RNAi} (GD) | 2 | VDRC | #45400 |
| <i>myoID</i> ^{RNAix2} | 3 | Labo Noselli | |
| <i>D-sas4</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #106051 |
| <i>D-sas6</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #110149 |
| <i>D-sak</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #105102 |
| <i>dila</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #103788 |
| <i>dila</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #32668 |
| <i>D-rfx</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #10416 |
| <i>par3</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #2914 |
| <i>par3</i> ^{RNAi} | 3 | Labo Budnick | |
| <i>par6</i> ^{RNAi} | 3 | VDRC | #19731 |
| <i>aPKC</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #105624 |
| <i>aPKC</i> ^{RNAi} | 2 | VDRC | #2907 |
| Constuction | Chr | Provenance | |
| <i>UAS::spastin</i> -GFP | 3 | Labo Daga | |

Tableau 2. Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude

| Recombinants | Chr | Sélection |
|--|-----|---|
| <i>klp64D^{RNAi}</i> (GD), <i>klp68D^{RNAi}</i> (GD) | 2 | couleur des yeux et PCR |
| <i>klp64D^{RNAi}</i> (GD), <i>kap3^{RNAi}</i> (GD) | 2 | couleur des yeux et PCR |
| <i>khc²⁷</i> , <i>myoID^{k2}</i> | 2 | couleur des yeux (<i>khc²⁷</i>) et phénotype (<i>myoID^{k2}</i>) |

Tableau 3. Lignées recombinantes établies au cours de cette étude

2. Crible génétique

Le crible génétique a été réalisé en contexte très sensibilisé pour *myoID* en utilisant une lignée homozygote sinistralisée de génotype : *ptc::Gal4, myoID^{k1}; UAS::myoID^{RNAi}* et de phénotype centré sur une rotation sinistrale incomplète. *ptc::Gal4* s'exprime dans les compartiments antérieurs et postérieurs du A8 (organisateur D/G du génitalia) ainsi que dans les compartiments antérieurs du A9 et du A10 [4]. Chez les mutants *myoID^{k1}*, le gène *myoID* est délété au niveau du codon d'initiation. Cette lignée a été croisée à des déficiences individuelles des chromosomes 2 et 3 provenant du Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University). Les croisements ont été incubés à 25°C. Les phénotypes de rotation de la descendance hétérozygote *ptc::Gal4, myoID^{k1} / +; UAS::myoID^{RNAi} / Δ Df*; ont été comparés aux mouches hétérozygotes contrôles *ptc::Gal4, myoID^{k1} / +; UAS::myoID^{RNAi} / +*. Les phénotypes de rotation (méthode décrite dans la section 2.1) d'un minimum de 30 mouches mâles de la descendance ont été déterminés pour chaque croisement. Le crible primaire a été réalisé en utilisant de larges déficiences d'environ 720000 bases pour isoler les régions génomiques d'intérêt présentant des activités interagissant avec *myoID* et agissant positivement dans la voie sinistrale (régions sinistralisantes) ou dans la voie dextrale (régions dextralisantes). Le crible secondaire a ensuite été réalisé avec de plus petites déficiences d'environ 120000 bases (provenant de Exelisis pour la plupart) pour raffiner le nombre de loci à tester. Nous avons enfin procédé à un crible tertiaire utilisant des allèles mutants et des RNAi pour identifier les gènes candidats.

3. Phénotypes et marqueurs D/G

3.1 Phénotypes de rotation

Les dissections s'effectuent dans l'eau. Les phénotypes de rotation ont été déterminés comme suit :

1. par l'observation de l'angle θ de rotation de la plaque génitale externe (Figure 20B) (estimation de la valeur de l'angle de rotation)
2. couplée à une dissection de l'abdomen des mâles adultes afin de déterminer le sens de l'enroulement du canal déférent (*spermiduct*) au-dessus de l'intestin postérieur (*hindgut*) ce qui permet de déterminer le sens de rotation (Figure 20A). Les phénotypes de rotation sont subdivisés en quatre classes en fonction de la valeur θ (Figure 20B) de l'angle de rotation et du sens de rotation :
 - « DF » ou *Dextral Full* ($\theta = +360^\circ$): qui représente le phénotype (*situs solitus*) caractérisé par une rotation dextrale ou horaire complète de la plaque génitale (quand vue depuis le pôle postérieur).
 - « DP » ou *Dextral Partiel* : qui représente une rotation dextrale incomplète de la plaque génitale d'un angle θ appartenant à $[+1^\circ, +359^\circ]$. Les phénotypes de rotation dextrale incomplète ont été subdivisés en 4 quartiers en fonction de la valeur de l'angle θ (Figure 20C) :
 - $0^\circ \leq \theta < 90^\circ$ phénotype proche de l'absence de rotation (représenté en bleu très clair)
 - $90^\circ \leq \theta < 180^\circ$
 - $180^\circ \leq \theta < 270^\circ$
 - $270^\circ \leq \theta < 360^\circ$ phénotype proche du *situs solitus* (représenté en bleu très foncé)
 - « NR » ou *No Rotation* ($\theta = 0^\circ$) : En l'absence de rotation, le *spermiduct* reste parallèle à l'*hindgut* (pas d'enroulement du *spermiduct* au-dessus de l'*hindgut*)
 - « SP » ou *Sinistral Partial* : correspond à une rotation incomplète antihoraire ou dextrale de la plaque génitale. Les phénotypes sont subdivisés en 4 quartiers selon le même principe que précédemment mais avec $\theta < 0^\circ$
 - SF ou *Sinistral Full* ($\theta = -360^\circ$): correspond au phénotype *situs inversus* (rotation complète antihoraire)

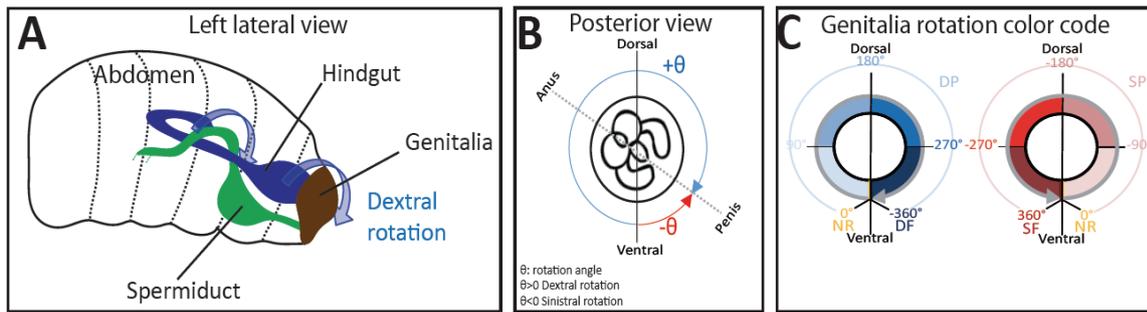


Figure 20. Rotation du génitalia mâle et détermination des phénotypes de rotation.

(A) Représentation schématique de l'enroulement du canal défèrent (*spermiduct*) au-dessus de l'intestin postérieur (*hindgut*) associée à la rotation horaire ou dextrale de 360° du génitalia auquel le canal défèrent est connecté. (B) Le phénotype de rotation correspond à l'angle entre l'axe Dorso-ventral et l'axe Anus-pénis (C) Représentation schématique de la vue postérieure d'un génitalia mâle adulte associée à la nomenclature des phénotypes et le code couleur correspondant aux angles de rotation. *Dextral Full* (« DF ») correspond à une rotation horaire complète (*situs solitus*), *dextral partial* (« DP ») correspond à une rotation horaire incomplète. En absence de rotation (*No rotation* ou « NR »), le *spermiduct* reste parallèle à l'*hindgut* (absence d'enroulement) et les mouches se développent symétriquement. De la même manière deux classes de phénotypes sinistres sont observés : *sinistral full* ou « SF » (rotation antihoraire complète) ou *sinistral partial* ou « SP » (rotation incomplète).

3.2 Phénotypes d'enroulement de l'*hindgut* adulte.

Cette méthode a été mise au point par Nicanor Gonzalez-Morales au laboratoire (non publié). Les mouches adultes sont récoltées puis incubées à température ambiante pendant 2 à 4 jours avec un milieu nutritif contenant un colorant alimentaire bleu (erioglaucine). Les mouches sont ensuite disséquées dans l'eau par ouverture (du postérieur vers l'antérieur) de la face dorsale de l'abdomen. L'*hindgut* se distingue des autres tissus par sa coloration bleue permettant de distinguer facilement le sens d'enroulement de l'*hindgut*. Trois phénotypes peuvent être distingués : phénotype dextral (*situs solitus*), absence d'enroulement (ou *mislooping*) ou enroulement inversé sinistral (*situs inversus*). Dans certains cas d'autres phénotypes peuvent être observés comme la troncation de l'*hindgut* ou une augmentation de volume du *midgut*. Ces anomalies conduisent le plus souvent à une létalité précoce des mouches adultes.

4. Système UAS/Gal4 et RNA interference chez la drosophile.

Le système d'expression UAS/Gal4 est un système très utilisé chez la drosophile [215] car il permet d'exprimer une construction donnée comme un RNAi ou la séquence codante d'un

gène sous le contrôle d'éléments régulateurs UAS dans un tissu spécifique. Le régulateur transcriptionnel Gal4 est une protéine de la levure qui se fixe aux séquences UAS pour activer l'expression du gène ou du RNAi (Figure 21). L'expression du Gal4 est lui-même sous le contrôle d'un promoteur spécifique (lignée pilote) (Tableau 2) qui permet de cibler le tissu dans lequel la séquence est exprimée et la fenêtre temporelle d'expression.

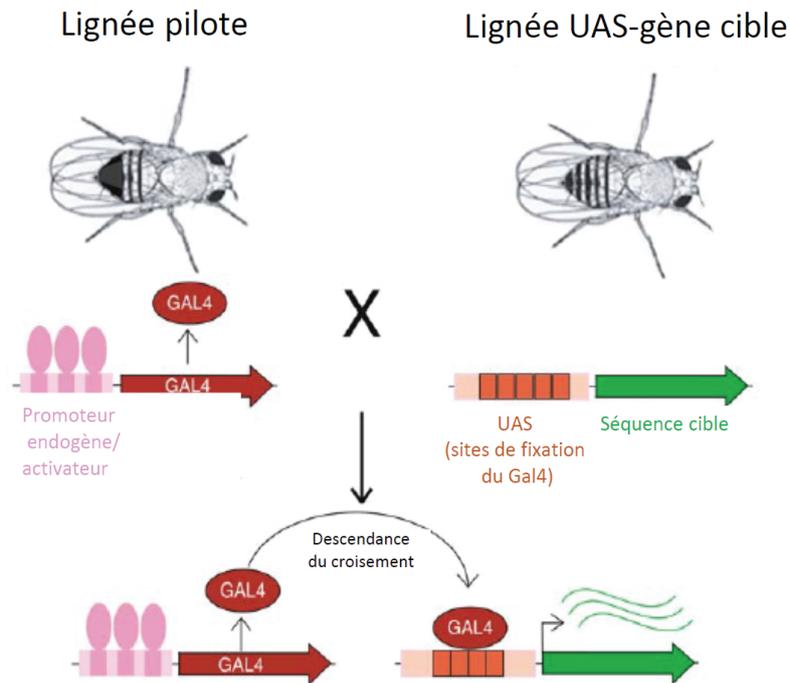


Figure 21. Présentation du système UAS/Gal4 (adapté de [216])

L'extinction d'un gène par *RNA interference* (RNAi) est une approche perte de fonction. Elle repose sur une interférence post-transcriptionnelle du RNAi avec un ARN messager spécifique conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine. De la même manière que décrit précédemment, l'utilisation du système UAS/Gal4 permet l'expression de la construction RNAi dans un tissu d'intérêt (Tableau 2 et 3). Ceci présente l'avantage de pouvoir réaliser des analyses perte de fonction dans un sous-ensemble de cellules ou un tissu spécifique. Les RNAi peuvent également être utilisés pour déterminer la fenêtre temporelle d'activité d'une protéine en utilisant le système thermosensible TARGET [217] (décrit dans la section 4). Cependant, l'efficacité de l'inactivation génique peut varier fortement d'une construction RNAi à l'autre et dépend de la demi-vie de la protéine et de l'ARN messager. De plus certains RNAi présentent un effet « hors-cible » ou *off-target* qui peut survenir lorsque le RNAi exprimé comporte une complémentarité suffisante ou une

homologie suffisante avec un ARN messenger qui n'était pas destiné à être ciblé. Ce ciblage non spécifique peut induire l'apparition de phénotypes indépendants du gène ciblé et pour lequel le RNAi était utilisé [218]. Cet effet *off-target* peut être contrôlé en :

- Utilisant des RNAi dont le nombre de *off-targets* estimé est nul ou proche de 0 (ou dont la spécificité a été démontrée et publiée)
- Confirmant les phénotypes par l'utilisation de plusieurs séquences RNAi différentes pour inactiver le même gène.
- Réalisant un sauvetage phénotypique afin de démontrer la spécificité du RNAi

Dans l'étude présentée dans cette thèse, les inactivations géniques ont été réalisées à 29°C (sauf lorsque mentionné) et peuvent nécessiter la surexpression concomitante de Dicer 2 [219] (composant du complexe RISC) pour augmenter l'efficacité de l'extinction génique.

5. Détermination de la fenêtre temporelle d'activité d'une protéine.

Le Gal80 est un répresseur du Gal4. Il agit en se liant au domaine d'activation du Gal4 et empêche ainsi l'interaction entre le Gal4 et la machinerie transcriptionnelle de la levure [220]. Ce système a été introduit chez la mouche en 1993 [215]. L'expression conditionnelle d'un gène ou d'un RNAi dépend de l'expression ubiquitaire (par fusion avec le promoteur ubiquitaire de la tubuline: Tub-Gal80^{ts}) du Gal80 qui est thermosensible. Le répresseur Gal80 est dégradé à 29°C, le Gal4 est donc exprimé et active l'expression génique (ou du RNAi) (Figure 22) [217]. 29°C est donc la température **permissive** pour le Gal4. En revanche, le répresseur Gal80 est actif à 23°C ce qui inhibe l'expression génique (induite par le Gal4) par conséquent 23°C est la température **restrictive** pour le Gal4. Le fait de changer la température d'incubation des croisements (de 23° à 29° et/ou de 29° à 23°) permet de moduler l'expression d'un gène ou d'une construction de manière spatio-temporelle. Ce système peut donc être utilisé pour déterminer la fenêtre d'activité d'une protéine dans un processus développemental comme l'asymétrie D/G. En revanche la précision de cette technique dépend de la demi-vie de la protéine et de l'ARN messenger ainsi que de la précision d'activation/répression du système UAS/Gal4.

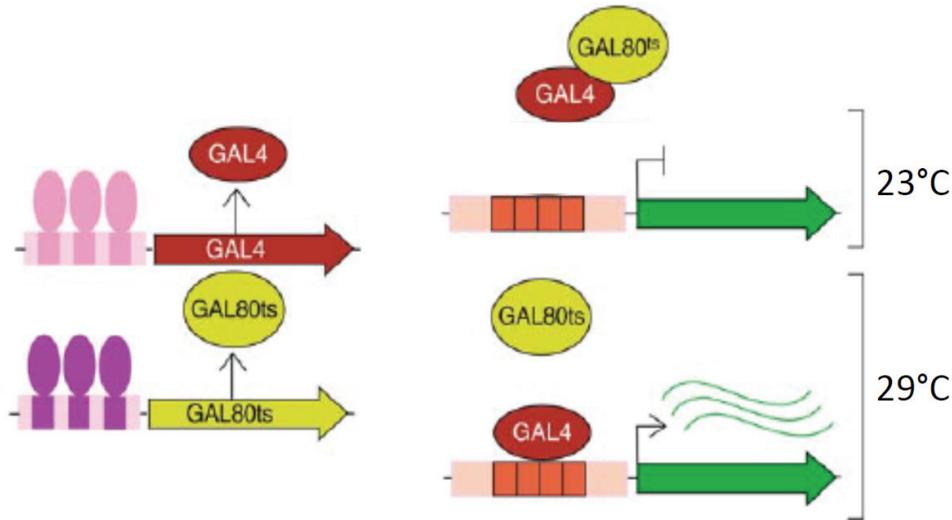


Figure 22. Contrôle temporel du système UAS/Gal4 : utilisation du répresseur Gal80 (adapté de [216])

6. Immuno-marquages et analyse d'images.

6-1 Dissection et marquage de l'*hindgut* à 9 heures après formation de la puppe à 25°C (protocole adapté de [221]).

1. Les immuno-marquages sur les *hindgut* à 9 h AFP sont réalisés comme suit:
2. Les pré-pupes sont collectées et placées dans une chambre humide à 25°C (on considère que ces pré-pupes sont au stade 0 h AFP).
3. Après être restées 9 heures dans l'incubateur à 25°C, les pupes sont détachées du support et disséquées dans du PBS 1X. La dissection est réalisée en éliminant avec précaution la partie antérieure de la case pupale puis en incisant la partie postérieure et enfin en sortant l'ensemble de la puppe de la case pupale.
4. La puppe est ensuite incisée dans sa partie antérieure ce qui permet de faire sortir l'ensemble des organes dont l'intestin (technique dite du *inside-out*). L'ensemble est placé dans du PBS 1X.
5. Les tissus sont fixés pendant 10 min à température ambiante dans une solution de PBS-Formaldéhyde 4%.
6. 1 rinçage 10 min au PBS.
7. 3 rinçages 15 min au PBS-Tween 0,3% (PBS-T).

8. Incubation dans une solution de blocage (PBS 1X, BSA 5%, Fetal Calf Serum 2%, Sodium Azide 0,02%, Triton 0,3%) pendant 2 heures à température ambiante.
9. Incubation avec l'anticorps primaire pendant la nuit dans la solution de blocage précédente
10. Les tissus sont rincés 4 x 15 minutes avec le PBS-T 0,3%.
11. Incubation des tissus avec l'anticorps secondaire à la dilution appropriée (dans le tampon de blocage PBS-T/BSA 5%).
12. Rinçage 4 x 15 min dans le PBS-T 0,3%.
13. Montage entre lame et lamelle dans du mowiol
14. Observation au microscope confocal Zeiss 780 (Objectif 63X)

6.2 Dissection et marquage de l'*hindgut* des mouches adultes.

La dissection des mouches adultes se déroule comme suit :

1. Les mouches adultes sont disséquées dans du PBS 1X en réalisant une incision de la face dorsale de l'abdomen (comme décrit dans la section 2.2).
2. La cuticule de la face dorsale est éliminée avec précaution laissant apparaître l'intestin et les testicules ou les ovaires.
3. Fixation 10 min (comme décrit précédemment)
4. 1 rinçage 10 min au PBS.
5. 3 rinçages 15 min au PBS-Tween 0,3% (PBS-T)
6. 1 rinçage 15 min au PBS
7. Incubation dans une solution de Phalloïdine-TRITC 1/400 dans PBS pendant 10 min à température ambiante.
8. Dissection complète en éliminant le thorax et les organes reproducteurs (testicules ou ovaires)
9. Montage entre lame et lamelle dans du mowiol
10. Observation au microscope confocal Zeiss 780 (Objectif 10X)

6.3 Analyse d’images par Image J.

La chiralité des cellules de l’*hindgut* à 9 heures AFP a été analysée grâce au *plugin* « *directionality* » du logiciel Image J selon la méthode décrite dans [222]. Pour cette analyse les images de la zone de prolifération de l’*hindgut* 9 heures AFP ont été prises avec le microscope confocal Zeiss 780 (Objectif 63X). Ces images ont été inversées verticalement avec le logiciel Image J. Puis l’orientation des bordures cellulaires a été analysée par la méthode d’orientation locale du gradient. 6 *hindguts* ont été analysés dans chaque condition.

| anticorps | provenance | espèce | dilution |
|------------------------|-------------|--------------------|----------|
| anticorps primaires | | | |
| DE-cadhérine | DSHB | Rat | 1/30 |
| Armadillo | DSHB | souris | 1/30 |
| Bazooka/Par-3 | Labo Wordaz | Lapin | 1/1000 |
| Dlg | DSHB | souris | 1/30 |
| anticorps secondaires | | | |
| Alexa 488 | Invitrogen | lapin, rat, souris | 1/400 |
| Alexa 546 | Invitrogen | lapin, rat, souris | 1/400 |
| Cy5 | Invitrogen | souris | 1/100 |
| autres | | | |
| Phalloïdine (actine-F) | Sigma | | 1/1000 |
| DAPI (ADN) | Hochst | | 1/1000 |

Tableau 4. Liste des anticorps utilisés dans cette étude

Troisième partie : Résultats

1. Présentation du crible génétique modificateur en contexte sensibilisé pour myoID.

Un premier crible en contexte sensibilisé pour *myoID* avait permis d'identifier Abd-B comme un régulateur majeur de la détermination D/G en amont de MyoID [137]. Afin d'identifier de nouveaux partenaires interagissant avec *myoID* et d'isoler des composants de la voie sinistrale, nous avons entrepris un nouveau crible génétique dans un contexte plus sensibilisé pour *myoID* que précédemment. Ce contexte génétique reposait sur une forte réduction de l'expression de *myoID* dans le segment A8 du disque génital en utilisant la lignée *ptc::Gal4, myoID^{kl} ; UAS::myoID^{RNAi}*. Le phénotype de cette lignée est centré sur une rotation sinistrale incomplète permettant l'identification de deux types d'activités : celles induisant une aggravation de la sinistralisation et celles induisant un sauvetage phénotypique tendant vers une dextralisation. Il faut noter cependant qu'une divergence de la lignée sensibilisée a été constatée au cours du crible. Le phénotype de cette lignée a en effet évolué spontanément d'un phénotype très pénétrant de rotation sinistrale incomplète (98,5% de mouches présentant une rotation sinistrale partielle) vers une aggravation de la sinistralisation (20% de mouches présentant une rotation sinistrale complète ou SF). Le seuil à partir duquel les régions ont été sélectionnées a donc été corrigé au cours du crible afin de prendre en compte cette divergence, il est passé de 20% de mouches *Sinistral Full* (SF) à 60% de mouches SF. Ceci a également nécessité de contrôler régulièrement le phénotype de la souche sinistralisée afin de suivre l'évolution de la divergence.

Des délétions couvrant le locus du gène *myoID* ont été utilisées pour valider le crible (données non présentées). Une collection de 500 grandes déficiences chromosomiques cytologiquement définies couvrant la majeure partie du second et du troisième chromosome ont été croisées à ce contexte sensibilisé. Ceci nous a permis d'identifier 11 régions génomiques sur le second chromosome et 19 régions sur le troisième chromosome contenant des activités sinistralisées (régions supprimeuses) ou dextrales (régions activatrices).

Afin de réduire le nombre de loci à tester, un crible secondaire a été réalisé en utilisant plus de 350 déficiences de taille inférieure aux précédentes (cf. Annexe 1).

Enfin un crible tertiaire utilisant des RNAi ou des allèles mutants a été effectué pour isoler le locus (ou les loci) interagissant avec *myoID*. Cette approche systématique a permis d'identifier cinq gènes interagissant avec *myoID*, dont deux sur le troisième chromosome.

2. *Lost*, un nouveau gène interagissant avec *myoID*.

Ce crible nous a permis d'isoler, entre autres, deux grandes déficiences, $\Delta 9226$ et $\Delta 9197$, induisant une aggravation de la sinistralisation. Ces deux déficiences induisent en effet un phénotype supérieur à 60% de mouches SF.

Nous avons ensuite utilisé 9 déficiences chevauchantes, de taille inférieure, pour réduire la région génomique interagissant avec *myoID*. $\Delta 24342$, couvrant le segment 82A5-82B2, induit une aggravation de la sinistralisation similaire à $\Delta 9226$ et $\Delta 9197$. En revanche, $\Delta 9196$, $\Delta 9075$ et $\Delta 9720$ induisent un phénotype inférieur à 60% de mouches SF. Ceci nous a donc permis de réduire la région génomique interagissant avec *myoID* au segment 82A5-82B1 (Figure 1A et 1B) contenant 10 gènes. L'utilisation de RNAi ciblant chacun des gènes (cf. annexe 1) et du mutant *lost*^{c02107} nous a permis d'identifier le gène *lost* (CG14648) comme un gène interagissant avec *myoID*. En effet, en contexte sensibilisé, *lost*^{c02107} induit une forte aggravation de la sinistralisation. En condition sensibilisée pour *myoID*, le phénotype passe en effet de 20% de mouches SF pour la condition contrôle à plus de 50% de mouches SF pour la condition mutante (Figure 23C). Cette interaction a été confirmée en utilisant le mutant *lost*^{c02107} en contexte mutant *myoID*^{-/-} (Figure 1D). Ces résultats indiquent donc que *lost* agit positivement sur l'activité de MyoID et suggèrent qu'il n'appartient pas à la voie sinistrale. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour démontrer que *Lost* est requis dans la voie dextrale lors de la détermination D/G.

Le gène *lost* code une protéine retrouvée dans les ovaires de la drosophile au sein de structures contenant des RNPs [223]. *Lost* est également un constituant des complexes RNP isolés de cellules en culture [223-226]. Durant l'ovogenèse de la drosophile, *lost* est impliqué dans la localisation (phase tardive) de l'ARNm *oskar* [227]. L'analyse de la séquence polypeptidique de *Lost* montre qu'il contient un domaine 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF) cyclo-ligase putatif qui présente 35% d'homologie avec les domaines 5-FTHF cyclo-ligase de l'humain [227]. Les FTHF cyclo-ligases sont des composants essentiels du métabolisme du folate (ou acide folique) chez l'humain [228, 229] mais leur fonction reste néanmoins inconnue chez la drosophile. Il a par ailleurs été montré que le métabolisme du folate pourrait

jouer un rôle dans la mise en place de l'axe D/G lors du développement précoce de la souris [230, 231].

Des investigations complémentaires seraient nécessaires pour déterminer si d'autres activités enzymatiques liées au métabolisme du folate sont requises pour la détermination D/G chez la drosophile. Ceci nécessiterait en premier lieu des analyses d'homologie *in silico* puis l'inactivation des gènes liés au métabolisme du folate.

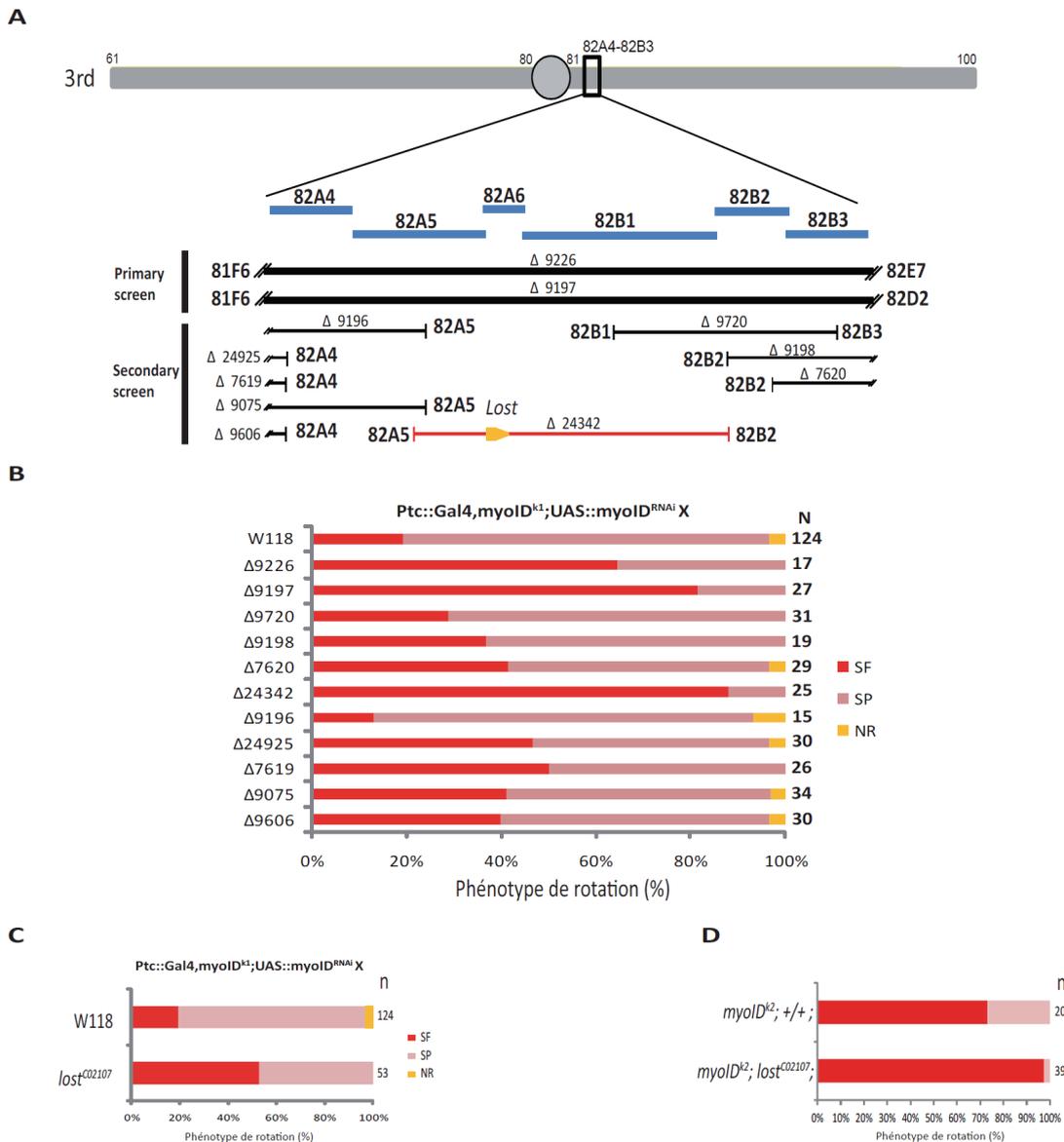


Figure 23. Identification de *lost* comme un nouveau gène interagissant avec *myoID*.

(A) Représentation schématique du troisième chromosome de la drosophile et de la région génomique 81F6-82E7 couverte par Δ9226 et Δ9197. Les petites délétions utilisées pour isoler le gène *lost* (CG14648) sont représentées. (B) Graphique compilant les phénotypes de rotation du génitalia en contexte sensibilisé pour *myoID*. (C) Phénotype de rotation du génitalia induit par le mutant *lost*^{CG2107} en contexte sensibilisé pour *myoID*. (D) Phénotype de rotation du génitalia induit par le mutant *lost*^{CG2107} en contexte *myoID*^{Δ2}.

3. La Kinésine-2, un nouvel acteur de la voie dextrale.

3.1 *klp64D* et *klp68D* interagissent génétiquement avec *myoID*.

Ce crible modificateur a également permis d'isoler une autre région génomique induisant une aggravation de la sinistralisation (20% des mouches mâles présentent une rotation sinistrale complète de leur génitalia). Cette région correspond au segment 64C1-64E1 couvert par la grande déficience $\Delta 24395$ (Figure 24A). Par conséquent, cette région génomique couvre un ou plusieurs gènes agissant positivement sur l'activité de *myoID*. $\Delta 24395$ couvre plus de 120 loci. Nous avons utilisé les petites délétions chevauchantes $\Delta 7583$ et $\Delta 7584$ afin de réduire la région d'intérêt (Figure 24B). $\Delta 7583$ induit une aggravation de la sinistralisation similaire à $\Delta 24395$ alors que $\Delta 7584$ induit un phénotype comparable au contrôle. Ceci nous a donc permis de réduire la région d'intérêt au segment 64C8-64C13, qui contient 4 gènes. L'utilisation de la délétion *Def(3L)Klp64D*^{A8.n123} supprimant uniquement le gène *klp64D* induit une aggravation de la sinistralisation similaire à $\Delta 7583$. Par conséquent, ceci indique que *klp64D* (CG10642) interagit génétiquement avec *myoID*.

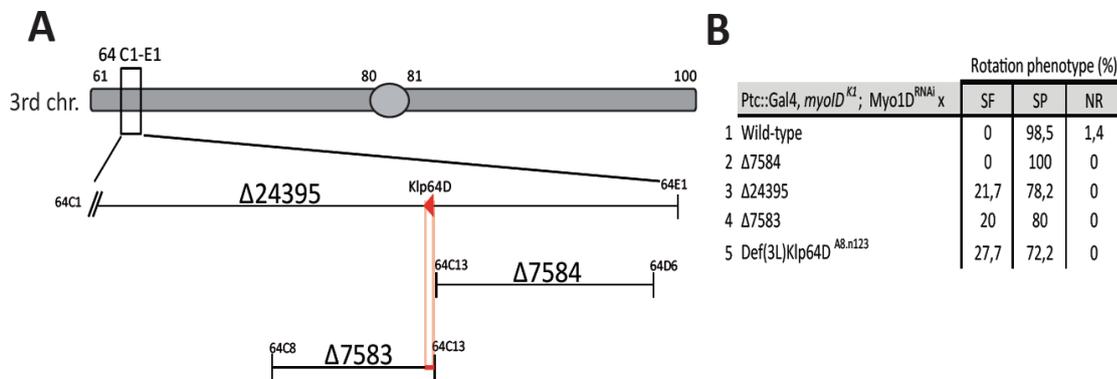


Figure 24. Un crible génétique modificateur identifie *klp64D* comme un nouveau gène interagissant avec *myoID*.

(A) Représentation schématique du troisième chromosome de la drosophile et de la région génomique 64C1-64E1 couverte par $\Delta 24395$. Les petites délétions utilisées pour isoler le gène *klp64D* (64C13) sont représentées. (B) Tableau compilant les phénotypes de rotation du génitalia dans le contexte sensibilisé pour *myoID*. Les délétions $\Delta 24395$ et $\Delta 7583$ interagissent génétiquement avec *myoID* en aggravant la sinistralisation. Aucune interaction génétique n'est observée entre *myoID* et la délétion $\Delta 7584$. L'interaction génétique entre *klp64D* et *myoID* est confirmée grâce à *Def(3L)Klp64D*^{A8.n123}.

Le gène *klp64D* code une sous-unité motrice de la Kinésine-2 [181]. Comme nous l'avons vu précédemment, les analyses de séquences des différentes sous-unités de la Kinésine-2 permettent de prédire que chez la drosophile, seule la Kinésine-2 hétérotrimérique

constituée de Klp64D/Klp68D/Kap3 pourrait se former. Nous avons donc voulu déterminer si l'ensemble du complexe Kinésine-2 interagissait avec *myoID*. Pour ce faire, nous avons observé les phénotypes de rotation du génitalia dans différentes conditions permettant de tester les mutants de *klp64D* (*Def(3L)klp64D^{A8.n123}*) ou de *klp68D* (*klp68D^{EY00199}* et *klp68D^{KG03849}*) en contexte *myoID^{-/-}* (Figure 25). En contexte *myoID^{-/-}*, les mutants hypomorphes homozygotes de *klp68D* induisent une forte aggravation de la sinistralisation indiquant que *klp68D* (CG7293), comme *klp64D*, interagissent génétiquement avec *myoID*. En revanche la sous-unité *khc* codant pour la sous-unité motrice de la Kinésine-1 interagit très faiblement avec *myoID* (Figure 25). Ceci suggère que l'action de la Kinésine-2 sur l'activité de MyoID serait spécifique. Néanmoins, afin de démontrer cette spécificité et d'identifier d'éventuelles redondances fonctionnelles avec d'autres kinésines, les interactions génétiques entre *myoID* et les gènes codant les sous-unités des différentes kinésines retrouvées chez la drosophile devraient être étudiées.

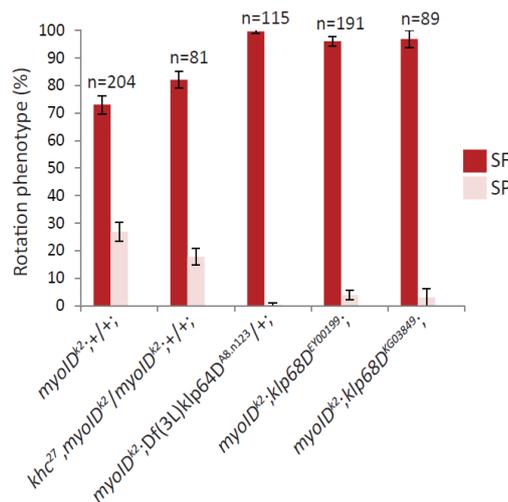


Figure 25. La Kinésine-2 hétérotrimérique dans son ensemble est impliquée dans la détermination D/G

Klp64D et *klp68D* interagissent génétiquement avec *myoID*. Les allèles mutants utilisés sont des allèles nuls pour *myoID* (*myoID^{k2}*) et *klp64D* (*Def(3L)Klp64D^{A8.n123}*) et des allèles hypomorphes pour *klp68D* (*klp68D^{EY00199}* et *klp68D^{KG03849}*). Le graphique montre le pourcentage de chaque classe de phénotypes associés à la rotation du génitalia en contexte *myoID^{-/-}* (« SF » signifie *Sinistral Full* et « SP » signifie *Sinistral Partial*). Les moyennes et les écarts-types sont représentés.

Nous montrons donc ici que les gènes *klp64D* et *klp68D* codant les sous-unités motrices de la Kinésine-2 interagissent avec *myoID*. Ces résultats indiquent également que ces gènes ne sont pas impliqués dans la voie sinistrale puisque leur déplétion en contexte *myoID^{-/-}* induit une aggravation de la sinistralisation. Ces données suggèrent par conséquent que la Kinésine-2 pourrait être impliquée dans la voie dextérale.

3.2 La Kinésine-2, un partenaire fonctionnel de MyoID.

3.2.1 Rôle de la Kinésine-2 dans la détermination dextrale.

Nous souhaitons en premier lieu évaluer l'implication de la Kinésine-2 dans la voie dextrale. Pour cela, nous avons procédé à l'inactivation, par RNAi, dans l'ensemble du segment A8 (organisateur D/G du génitalia), de chaque gène codant les différentes sous-unités du complexe. Afin de renforcer l'extinction de l'activité de la Kinésine-2, une combinaison de deux RNAi ciblant les sous-unités Klp64D/Kap3 ou Klp64D/Klp68D a également été testée. Les RNAi ont été exprimés grâce aux pilotes d'expression *myoID::Gal4*, *Abd-b::Gal4*, la combinaison *myoID::Gal4 ; Abd-b::Gal4* et *tsh::Gal4*. Ces pilotes s'expriment spécifiquement dans le segment A8 du disque génital [4]. L'utilisation de plusieurs pilotes a permis d'optimiser l'extinction de l'activité de la Kinésine-2 tout en limitant la létalité induite. En particulier nous avons pu constater que l'utilisation du pilote d'expression *tsh::Gal4* pour l'inactivation des gènes codant la Kinésine-2 s'accompagnait d'une forte létalité aux stades pharate et adulte (à 25°C comme à 29°C) (Tableau 5, lignes 11,12,14). Ce pilote est en effet exprimé dans d'autres tissus tels que le disque d'œil, le disque d'aile et le système nerveux [232]. Afin de limiter cette létalité, tout en augmentant le niveau d'expression des RNAi dans le segment A8, nous avons utilisé une combinaison des deux pilotes d'expression *myoID::Gal4* et *Abd-b::Gal4*, s'exprimant spécifiquement dans le segment A8 et dont l'expression dans les autres tissus est limitée.

L'expression de la GFP a été utilisée comme contrôle négatif et induit un phénotype similaire aux mouches sauvages (100% de rotation dextrale complète). Suite à la surexpression de la spastine (protéine qui sectionne les microtubules [233]) dans le segment A8, on observe une majorité de mouches présentant un phénotype de rotation dextrale incomplète. De plus, cette surexpression de la spastine induit un phénotype proche de l'absence de rotation pour 20% des mâles (1°-90°) (Tableau 5, ligne 2) ou une létalité complète (Tableau 5, lignes 9 et 17). Ceci montre que la déstabilisation des microtubules dans l'organisateur D/G affecte la rotation directionnelle du génitalia. D'autre part la surexpression de la spastine a permis d'évaluer le phénotype final induit par une déstabilisation des microtubules pour chaque pilote d'expression.

L'extinction de l'activité des sous-unités de la Kinésine-2 induit des phénotypes de rotation dextrale incomplète, de pénétrance variable. Dans la plupart des cas, l'inactivation de *kpl68D* entraîne une létalité au stade larvaire indiquant que Klp68D joue un rôle essentiel lors

du développement (Tableau 5, lignes 11, 12, 14, 20 et 22). Dans les conditions d'extinction de l'activité de la Kinésine-2 les plus fortes, nous observons des phénotypes d'absence de rotation (0°) (Tableau 5, ligne 18) ou proches de la non-rotation ($1-90^\circ$) (Tableau 5, lignes 15, 19, 21 et 23). Ceci indique que l'absence totale d'asymétrie D/G (absence de rotation du génitalia) pourrait constituer le phénotype final suite à une inactivation complète du complexe Kinésine-2.

Ces résultats montrent que la Kinésine-2 joue un rôle important dans la rotation dextrale du génitalia. Une expérience de sauvetage phénotypique devrait néanmoins être réalisée en raison des risques d'effet *off-target* (abordé dans matériel et méthodes section 3). Nous pourrions pour cela exprimer l'homologue murin mKIF3A en condition sensibilisée pour *klp64D* (l'homologue murin mKIF3A étant capable de sauver les phénotypes mutants de *klp64D* dans les photorécepteurs et dans les cellules neuronales ciliées [172, 234]). Ceci permettrait de démontrer que les défauts de rotation observés sont dus à l'inactivation spécifique du gène *klp64D*.

| | Rotation phenotype (%) | | | | |
|--|------------------------|--------------|--------|-------|-------|
| | No rotation | Dextral | | | |
| | | 90° | 180° | 270° | 360° |
| Abd-B, UD2 > | 0° | | | | |
| 1 <i>GFP</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 2 <i>Spas-GFP</i> | 0 | 21,42 | 26,19 | 16,66 | 35,71 |
| 3 <i>klp64D^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 1,38 | 5,55 | 30,55 | 62,5 |
| 4 <i>klp68D^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 0 | 4,76 | 38,09 | 57,14 |
| 5 <i>kap3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 2,56 | 5,12 | 33,3 | 58,97 |
| 6 <i>klp64D^{RNAi} (GD), klp68D^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 0 | 12,5 | 37,5 | 50 |
| 7 <i>klp64D^{RNAi} (GD), kap3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 1,58 | 4,76 | 57,14 | 36,5 |
| tsh > | | | | | |
| 8 <i>GFP</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 9 <i>Spas-GFP</i> | | | Lethal | | |
| 10 <i>klp64D^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 3,8 | 15,38 | 57,69 | 23,07 |
| 11 <i>klp68D^{RNAi} (KK)</i> | | | Lethal | | |
| 12 <i>klp68D^{RNAi} (GD)</i> | | | Lethal | | |
| 13 <i>kap3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 0 | 0 | 11,1 | 88,8 |
| 14 <i>klp64D^{RNAi} (GD), klp68D^{RNAi} (GD)</i> | | | Lethal | | |
| 15 <i>klp64D^{RNAi} (GD), kap3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 71,87 | 18,75 | 6,25 | 3,12 |
| myoID; Abd-B, UD2 > | | | | | |
| 16 <i>GFP</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 17 <i>Spas-GFP</i> | | | Lethal | | |
| 18 <i>klp64D^{RNAi} (GD)</i> | 10,81 | 2,8 | 21,62 | 51,35 | 13,51 |
| 19 <i>klp68D^{RNAi} (KK)</i> | 0 | 38,46 | 38,46 | 19,23 | 3,84 |
| 20 <i>klp68D^{RNAi} (GD)</i> | | | Lethal | | |
| 21 <i>kap3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 19,35 | 22,58 | 41,93 | 16,12 |
| 22 <i>klp64D^{RNAi} (GD), KLP68D^{RNAi} (GD)</i> | | | Lethal | | |
| 23 <i>klp64D^{RNAi} (GD), KAP3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| myoID, UD2 > | | | | | |
| 24 <i>klp64D^{RNAi} (GD), kap3^{RNAi} (GD)</i> | 0 | 0 | 0 | 3,5 | 96,4 |

Tableau 5. Phénotypes de rotation du génitalia mâle associés à l'inactivation des gènes codant les sous-unités de la Kinésine-2.

Afin de faciliter la lecture du tableau « ::Gal4 » a été substitué par « > ». Pour les constructions UAS, seule la séquence exprimée est mentionnée et placée après le signe « > ». UD2 se réfère à « UAS ::Dicer2 ».

3.2.2 Fenêtre d'activité de Klp64D.

Nous souhaitons ensuite déterminer la fenêtre d'activité de Klp64D par rapport à MyoID. Pour ce faire, nous avons utilisé un système d'expression thermosensible qui permet de moduler l'expression des RNAi ciblant *klp64D* ou *myoID* dans le segment A8 à différents stades du développement. Puis nous avons déterminé le pourcentage de mâles adultes présentant un phénotype de rotation partielle ou de non-rotation. La détermination de la fenêtre d'activité de Klp64D a nécessité l'utilisation d'une combinaison de deux pilotes d'expression : *myoID::Gal4* ; *Abd-b::Gal4* pour optimiser les phénotypes tout en limitant la létalité associée.

Nous montrons que le pic d'activité de Klp64D se situe entre le jour 6 et le jour 7 du développement et coïncide avec le pic d'activité de MyoID (Figure 26). Ceci est cohérent avec la fenêtre d'activité de MyoID déterminée précédemment par notre équipe [4, 137, 138]. Nous en concluons que Klp64D et MyoID agissent de manière synchrone au cours de la détermination D/G.

Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec la mise en évidence de l'interaction génétique entre *myoID* et *klp64D*. L'ensemble de ces données établit pour la première fois l'implication d'un moteur microtubulaire dans la détermination D/G chez les invertébrés.

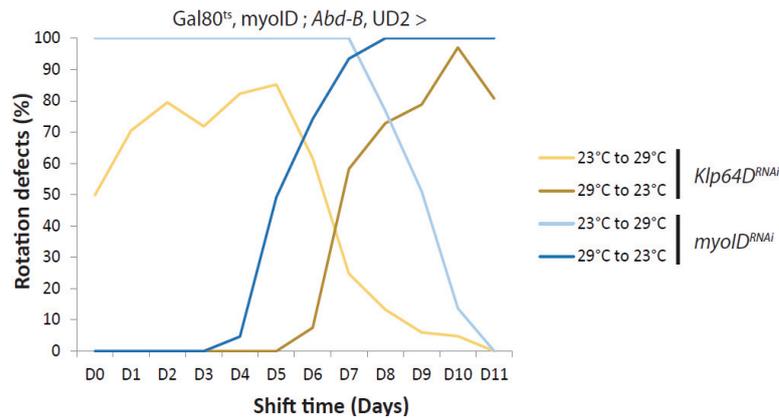


Figure 26. Fenêtre d'activité de Klp64D et MyoID.

Le système thermosensible TARGET [217] a été utilisé pour moduler l'expression des RNAi ciblant *klp64D* et *myoID* au cours du développement. L'extinction de l'activité des gènes *klp64D* et *myoID* a été déclenchée en modifiant la température d'incubation des mouches de 23°C (température restrictive pour l'expression du RNAi) à 29°C (température permissive pour l'expression du RNAi). Inversement, l'extinction de l'activité des gènes a été interrompue en modifiant la température d'incubation de 29°C à 23°C. Ceci a été effectué chaque jour du développement. Le graphique représente le pourcentage de mouches présentant un phénotype mutant de rotation partielle ou d'absence de rotation à chaque jour de développement.

3.3 Implication des cils dans l'asymétrie D/G chez la drosophile.

La Kinésine-2 est essentielle à l'assemblage des cils chez les mammifères [11-13], comme chez la drosophile [152]. Par ailleurs, chez certaines espèces de vertébrés, les cils du nœud sont impliqués dans la détermination D/G lors de la gastrulation [11-13]. Ainsi, les souris *KIF3A*^{-/-} et *KIF3B*^{-/-} dépourvues de cils au niveau du nœud présentent un *situs* aléatoire. Nous nous interrogeons ainsi sur l'éventualité d'une fonction ciliaire de la Kinésine-2 dans la détermination D/G chez la drosophile.

Les microtubules ciliaires et flagellaires sont l'objet d'une modification post-traductionnelle spécifique, appelée glutamylation [235]. Or, notre équipe a précédemment montré que la tubuline glutamylée n'était pas détectée dans le segment A8 du génitalia [4].

Nous avons donc souhaité confirmer ces observations en démontrant génétiquement que les cils n'étaient pas impliqués dans la détermination D/G chez la drosophile. Pour cela, nous avons procédé à l'inactivation dans le segment A8 des gènes *D-sas4*, *D-sas6*, *D-sak*, *Dilatory* et *Rfx* requis pour l'assemblage des cils chez la drosophile [236, 237]. L'inactivation de ces gènes n'affecte pas (ou de manière très marginale) la rotation du génitalia (Tableau 6).

Nous observons particulièrement que l'extinction de l'activité de *rfx* n'affecte pas la mise en place de l'axe D/G. Or, ce gène code un facteur de transcription qui est un régulateur clef de la ciliogenèse chez la drosophile, *C. elegans* et les mammifères [238]. De plus, chez la souris, la perte du gène *rfx3* conduit à des défauts d'établissement de l'axe D/G [239]. Nos résultats démontrent que les cils ne sont donc pas impliqués dans l'établissement de l'axe D/G chez la drosophile. Nous en déduisons par conséquent que, chez la drosophile, la Kinésine-2 exerce un rôle non ciliaire dans la détermination D/G.

| Abd-B, UD2 > | Transformant ID | Rotation phenotype (%) | | | | |
|------------------------------|-----------------|------------------------|---------|------|------|-------|
| | | No rotation | Dextral | | | Full |
| | | | 90° | 180° | 270° | |
| | | 0° | 90° | 180° | 270° | 360° |
| <i>D-Sas4^{RNAi}</i> | 106051 | 0 | 0 | 0 | 7,46 | 92,53 |
| <i>D-Sas6^{RNAi}</i> | 110149 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| <i>D-Sak^{RNAi}</i> | 105102 | 0 | 0 | 0 | 7,4 | 92,59 |
| <i>Dila^{RNAi}</i> | 103788 | 0 | 0 | 0 | 3,5 | 96,49 |
| | 32668 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| <i>D-Rfx^{RNAi}</i> | 10416 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

Tableau 6. Phénotypes de rotation du génitalia mâle associés à l'inactivation des gènes codant des protéines impliquées dans la ciliogenèse.

3.4 La Kinésine-2 est essentielle à la mise en place de l'axe D/G dans l'intestin adulte.

Nous souhaitons déterminer si la Kinésine-2 était également impliquée dans la détermination D/G de l'*hindgut* adulte, un autre marqueur de l'asymétrie D/G chez la drosophile. Même si l'évaluation de l'angle de rotation du génitalia reste la méthode la plus précise pour évaluer l'implication d'un gène dans la détermination D/G, l'utilisation de ce marqueur est complémentaire et présente un avantage certain. En effet, l'*hindgut* adulte permet d'analyser la mise en place de l'axe D/G non seulement chez les mâles mais aussi

chez les femelles. Par ailleurs, l'enroulement directionnel de l'intestin est également retrouvé chez les vertébrés [44].

Il a été précédemment montré que MyoID contrôle la formation de la boucle dextrale de l'*hindgut* adulte [114]. En outre, nous avons montré au laboratoire que l'établissement de l'axe D/G se fait de manière indépendante dans l'*hindgut* adulte et dans le génitalia (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle¹).

L'extinction concomitante de l'activité des gènes *klp64D* et *kap3* ou *klp64D* et *klp68D* mène à un phénotype très pénétrant d'absence d'enroulement de l'*hindgut* (Figure 27A, lignes 4 et 5 ; Figures 27D et 27E). Ce phénotype se caractérise par une forme presque linéaire de l'*hindgut*. Ceci indique que l'*hindgut* a perdu la capacité d'effectuer la boucle dextrale. De même, en contexte fortement sensibilisé pour *klp64D*, l'*hindgut* adulte ne présente pas d'enroulement (Figures 27A, ligne 3 et 27C).

La Kinésine-2 n'est donc pas spécifique à la mise en place de l'asymétrie D/G dans le génitalia mâle mais est également essentielle à la détermination D/G de l'*hindgut* adulte. Elle joue donc un rôle majeur dans l'établissement de l'axe D/G chez la drosophile. Ces résultats pourraient néanmoins être complétés en testant l'interaction génétique entre *myoID* et *klp64D* ou *klp68D* dans l'*hindgut* adulte. De plus, il serait intéressant d'étudier la fenêtre d'activité de Klp64D par rapport à MyoID dans l'*hindgut* adulte.

¹ Article en préparation

A

| Genotype | Adult hindgut phenotype (%) | | |
|---|-----------------------------|------------|---------|
| | other defects | Mislooping | Dextral |
| 1 Byn> | 0 | 0 | 100 |
| 2 Byn, UD2> klp64D ^{RNAi} | 0 | 29,4 | 70,5 |
| 3 Byn>klp64D ^{RNAi} ; Def(3L)klp64D ^{A8.n123/+} | 0 | 87 | 12,9 |
| 4 Byn>klp64D ^{RNAi} , kap3 ^{RNAi} | 0 | 89,4 | 10,5 |
| 5 Byn>klp64D ^{RNAi} , klp68D ^{RNAi} | 18,91 | 81 | 0 |
| 6 MyoID,UD2>klp64D ^{RNAi} , kap3 ^{RNAi} | 0 | 0 | 100 |

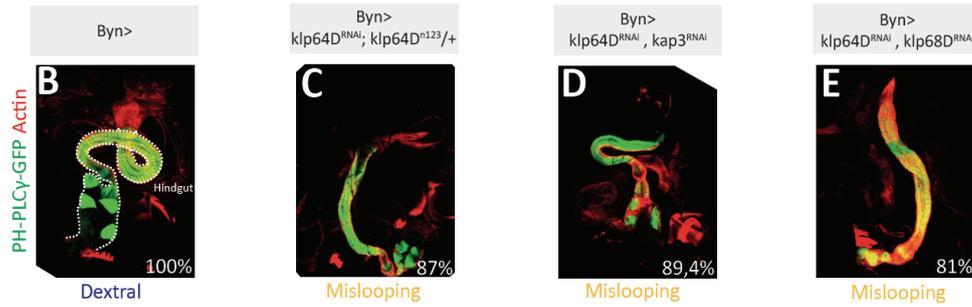


Figure 27. La Kinésine-2 est requise pour la rotation directionnelle de l'hindgut adulte.

(A) Tableau compilant les phénotypes d'enroulement de l'hindgut adulte associés à l'extinction des gènes codant les sous-unités de la Kinésine-2. (B-E) Vue dorsale de la partie postérieure de l'intestin des mouches adultes de génotypes : (B) *byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+*, (C) *klp64D^{RNAi} /+; byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/Def(3L)klp64D^{A8.n123}*, (D) *klp64D^{RNAi}, kap3^{RNAi}/+*; *Byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+*, (E) *klp64D^{RNAi}, klp68D^{RNAi}/+*; *Byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+*. L'hindgut de ces mouches est marqué par la GFP (vert). L'actine F est marquée par la phalloïdine (rouge). Le pourcentage d'hindguts adultes présentant un enroulement dextral (B) ou d'hindguts adultes présentant une absence d'enroulement (C-E) est indiqué.

Nous souhaitons préciser - au sein du segment A8 du génitalia et de la zone de prolifération de l'hindgut - le domaine cellulaire dans lequel l'activité de la Kinésine-2 est requise. Nous avons donc inactivé la Kinésine-2 spécifiquement dans le sous-ensemble de cellules qui expriment MyoID (que l'on appellera MID+), dans le segment A8 du génitalia et dans l'hindgut adulte, au moyen du pilote d'expression *myoID::Gal4*. De manière surprenante, l'inactivation du complexe dans les cellules MID+ n'affecte pas l'établissement de l'axe D/G (Tableau 5, ligne 24 et Figure 27A, ligne 6). Or, comme nous l'avons vu précédemment, l'inactivation de la Kinésine-2 dans l'ensemble des cellules (c'est-à-dire dans les cellules MID+ et MID-²) du segment A8 et de la zone de prolifération de l'hindgut adulte affecte la détermination D/G au niveau de ces organes (section 3.2.1). Ces résultats suggèrent donc que la Kinésine-2 pourrait être requise en aval de MyoID pour propager l'information directionnelle aux cellules MID-. Les autres contextes sensibilisés pour la Kinésine-2 pourraient également être testés dans les cellules MID+ dans le but de démontrer que

² Les cellules MID- n'expriment pas MyoID

l'ensemble du complexe Kinésine-2 n'est pas requis dans les cellules MID+ pour la détermination D/G.

Afin de préciser la fonction cellulaire exercée par la Kinésine-2 dans l'asymétrie D/G nous nous sommes d'abord intéressés à la forme et l'orientation des cellules MID- au sein de la zone de prolifération de l'*hindgut* adulte. Il a été montré précédemment que les cellules épithéliales de l'*hindgut embryonnaire* présentaient une orientation D/G biaisée dans le plan du tissu ; ce biais étant déterminant pour le sens d'enroulement de l'*hindgut embryonnaire* [139].

Nous avons analysé l'orientation des cellules dans le plan de l'épithélium en marquant les membranes grâce à l'expression du domaine PH-PLC γ (qui interagit avec les phospholipides membranaires [240]) fusionné à la GFP. Dans l'*hindgut adulte*, 9 heures après formation de la puppe (AFP), les cellules épithéliales présentent une orientation biaisée dans le plan du tissu. En effet, en condition sauvage, la bordure des cellules est plus fréquemment orientée selon un angle compris entre -90° et 0° par rapport à l'axe A/P (Figures 28A et 28C). En revanche, suite à l'extinction de l'activité de la Kinésine-2 dans l'*hindgut* adulte, la majorité des bordures cellulaires présente des angles dont les valeurs sont uniformément réparties autour de 0° (Figures 28B et 28D) ; la majorité des angles variant entre -20° et $+20^\circ$. Par conséquent, suite à l'inactivation de la Kinésine-2, les cellules MID- ne présentent plus d'orientation biaisée par rapport à l'axe A/P.

Ces résultats, à l'échelle tissulaire, sont cohérents avec les phénotypes d'absence d'enroulement de l'*hindgut* observés 9 heures AFP suite à l'inactivation de la Kinésine-2 (Figures 27A, ligne 4 et 27D). La Kinésine-2 est donc requise dans les cellules MID- pour la transmission du biais D/G qui détermine ensuite l'enroulement directionnel de l'*hindgut* adulte. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que la Kinésine-2 pouvait être impliquée dans le remodelage de la polarité épithéliale lors de la propagation de l'information directionnelle.

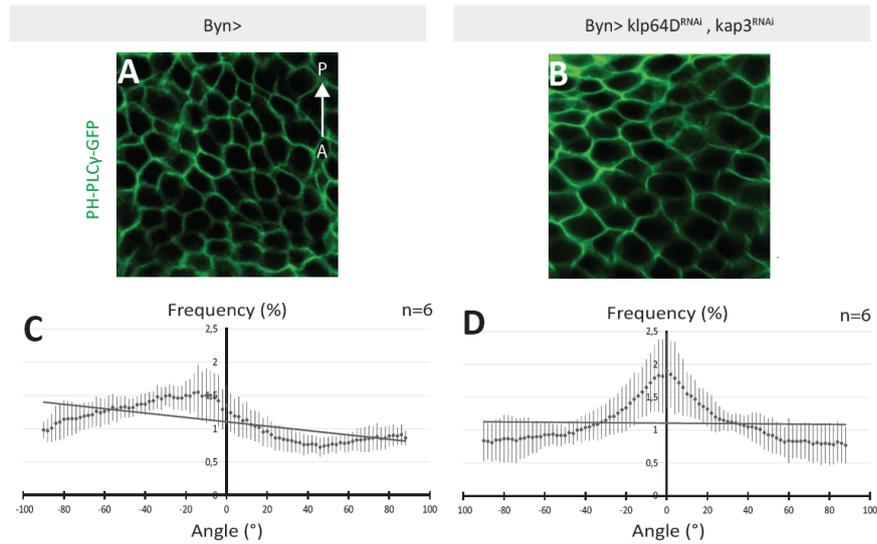


Figure 28. Chiralité des cellules MID- de l'hindgut adulte.

(A et B) Cellules MID- d'hindguts adultes à 9h AFP de génotypes : (A) *byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+* et (B) *klp64D^{RNAi}, kap3^{RNAi}/+; byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+*. La membrane des cellules MID- est marquée par la GFP. (C et D) Fréquence des bordures cellulaires orientées selon un intervalle de 20° par rapport à l'axe A/P. 0° correspond à une bordure cellulaire parallèle à l'axe A/P. Les moyennes et les écarts-types sont représentés.

3.5 La polarité apico-basale des cellules épithéliales de l'hindgut adulte ne dépend pas de l'activité de la Kinésine-2.

Chez la drosophile, la sous-unité Klp64D est requise pour la localisation correcte de Bazooka (homologue de Par3) et Armadillo (homologue de la β-caténine) aux jonctions adhérentes lors de la morphogenèse des photorécepteurs au cours du stade pupal [172]. Or, le laboratoire a montré que les jonctions adhérentes jouent le rôle de plateforme signalétique lors de la mise en place de l'axe D/G dans le génitalia [138]. Nous avons donc émis l'hypothèse que la Kinésine-2 pourrait être impliquée dans le remodelage des jonctions adhérentes et de la polarité apico-basale lors de l'établissement de l'axe D/G.

Chez la drosophile, on distingue les régulateurs de la polarité apicale et les régulateurs de la polarité baso-latérale qui interagissent fonctionnellement (interactions mutuellement compétitives) pour définir et/ou maintenir les limites entre les domaines membranaires selon l'axe apico-basal. Les régulateurs de la polarité apicale regroupent [241] : le complexe Crb (constitué de Crumbs, Stardust et PATJ), le complexe PAR (constitué de Bazooka, Par6 et aPKC), Cdc42 [242], la Moesine [243] et PTEN [244, 245]. Les régulateurs de la polarité baso-latérale regroupent les protéines du complexe Scribble (Scribble, Dlg et Lgl) ainsi que le

groupe Yurt/Coracle (constitué de Yurt, Coracle, Neurexin IV et l'ATPase Na^+/K^+) [246], Rac et la PI3K [244].

Nous avons, dans un premier temps, voulu déterminer si la perturbation de la polarité apico-basale pouvait affecter la rotation directionnelle du génitalia. Pour cela, nous avons exprimé dans le segment A8 du génitalia les RNAi ciblant les gènes codant les composants du complexe PAR (Bazooka, Par6 et l'*atypical protein kinase C*), des constituants du complexe Crumbs (Crumbs, Stardust) et du complexe basolatéral Scribble (Disc large et Lethal giant larvae) (Tableau 7). Suite à l'extinction de l'activité de ces gènes, la majorité des mouches mâles présentent un phénotype de rotation dextrale incomplète (Tableau 7, lignes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 et 10) (à l'exception de *stardust* dont l'inactivation n'affecte pas la rotation). Dans les conditions d'inactivation de *par3* et *par6* les plus fortes, un quart des mouches présentent un angle de rotation variant entre 0° et 180° (Tableau 7, lignes 2, 3 et 4). Suite à l'inactivation de *crb*, l'intégralité des mâles présentent un phénotype de rotation incomplète et un quart de ces mouches présentent un phénotype proche de la non-rotation (1° à 90°) (Tableau 7, ligne 7). L'inactivation des gènes *dlg* et *lgl* induit un phénotype de rotation incomplète tendant vers la non rotation (angle de rotation variant de 0° à 90°) (Tableau 7, lignes 9 et 10).

L'ensemble de ces données suggère donc que les complexes impliqués dans l'établissement et la maintenance de la polarité apico-basale sont requis pour la rotation directionnelle du génitalia. L'étude de l'implication de la polarité apico-basale dans la mise en place de l'axe D/G pourrait être complétée par l'évaluation de l'interaction génétique entre ces gènes et *myoID*.

| | <i>Abd-B, UD2 ></i> | Transformant ID | Rotation phenotype (%) | | | | |
|------------------|----------------------------|-----------------|------------------------|---------|------|------|------|
| | | | No rotation | Dextral | | | |
| | | | | 90° | 180° | 270° | 360° |
| 1 | <i>GFP</i> | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Par complex | | | | | | | |
| 2 | <i>Par3^{RNAi}</i> | 2914 | 2,2 | 6,8 | 15,9 | 38,6 | 36,3 |
| 3 | | - | 0 | 2,1 | 25,5 | 70,2 | 2,1 |
| 4 | <i>Par6^{RNAi}</i> | 19731 | 0 | 13,6 | 9 | 40,9 | 36,3 |
| 5 | <i>aPKC^{RNAi}</i> | 105624 | 0 | 0 | 8,3 | 66,6 | 25 |
| 6 | | 2907 | 0 | 3,8 | 11,5 | 53,8 | 30,7 |
| Crb complex | | | | | | | |
| 7 | <i>Crb^{RNAi}</i> | 39177 | 0 | 25,7 | 54,2 | 20 | 0 |
| 8 | <i>Sdt^{RNAi}</i> | 23822 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Scribble complex | | | | | | | |
| 9 | <i>Dlg^{RNAi}</i> | 41134 | 66,6 | 33,3 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | <i>Lgl^{RNAi}</i> | 51247 | 25,4 | 72,5 | 1,9 | 0 | 0 |

Tableau 7. Phénotypes de rotation du génitalia mâle associés à l'inactivation des principaux gènes impliqués dans la polarité apico-basale.

Nous avons ensuite voulu déterminer si la Kinésine-2 était nécessaire à la localisation sub-cellulaire des jonctions adhérentes et à la mise en place de la polarité apico-basale au cours de la morphogenèse asymétrique dans les cellules de la zone de prolifération de l'*hindgut* adulte. L'*hindgut* adulte, à la différence du génitalia, permet l'observation de la polarité cellulaire à la fois au stade larvaire (fin de stade L3) et en début de stade pupal.

Nous avons en premier lieu examiné la localisation sub-cellulaire des marqueurs des jonctions adhérentes (DE-cadhérine, β -caténine/Armadillo), du marqueur baso-latéral Dlg et du marqueur de polarité apicale Par3 au stade L3 dans les cellules épithéliales de l'*hindgut* adulte (Figure 29). Au stade L3, les cellules n'ont pas encore adopté d'orientation biaisée (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle). Nous n'observons aucune modification du marquage (baso-latéral) de Dlg (Figure 29 I-L) ou (apical) de Par3 (Figure 29 M-P) entre la condition contrôle et la condition mutante pour la Kinésine-2. De même, la comparaison des épithélia dans les deux conditions ne révèle pas de localisation anormale de la DE-Cadhérine (Figure 29 A-D) ou d'Armadillo (Figure 29 E-H).

Nous avons, dans un second temps, analysé l'épithélium de l'*hindgut* adulte 9 heures AFP (Figure 30), soit après l'adoption par les cellules d'une orientation D/G biaisée (Figure 28A et 28C). Nous n'observons aucune modification dans la distribution du domaine baso-latéral (marqué par Dlg) ou des jonctions adhérentes (marquées par DE-cadhérine) entre la

condition contrôle (Figure 30A et 30B) et la condition mutante pour la Kinésine-2 (Figure 30C et 30D) dans les cellules de l'*hindgut* adulte.

Lors de la détermination D/G, la fonction cellulaire de la Kinésine-2 ne semble donc pas reposer sur un remodelage de la polarité apico-basale et des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales de l'*hindgut* adulte.

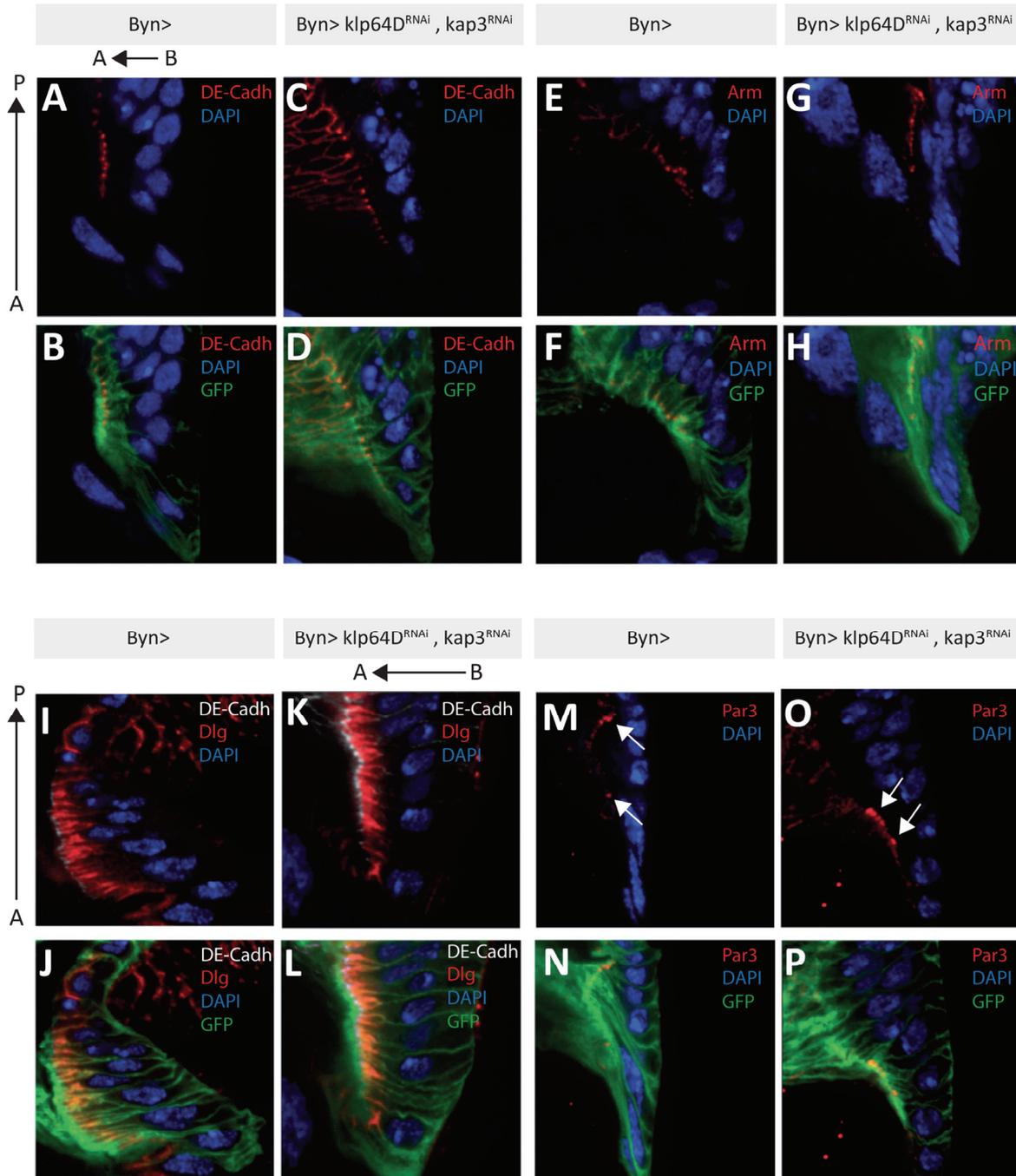


Figure 29. Localisation des jonctions adhérentes et polarité apico-basale des cellules épithéliales de l'*hindgut* adulte au stade larvaire 3

Localisation des composants des jonctions adhérentes : DE-Cadhérine (A-D) et Armadillo (E-H). Distribution du marqueur basolatéral Dlg (I-L) et du marqueur de polarité apicale Par3 (M-P) dans les cellules d'*hindguts* adultes de génotypes : (A-B,I-J,E-F,M-N) *byn::Gal4,UAS::PH-PLCγ-GFP/+* ou (C-D,G-H,K-L,O-P) *klp64D^{RNAi}, kap3^{RNAi}/+; byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+*. La membrane des cellules est marquée par la GFP (vert) et l'ADN est marqué au DAPI (bleu). L'orientation par rapport à l'axe antéro-postérieur (A/P) est indiquée, ainsi que l'orientation de l'épithélium par rapport à l'axe apico-basal (A/B). (M et O) Les flèches représentent la localisation du marquage de Par3 (rouge).

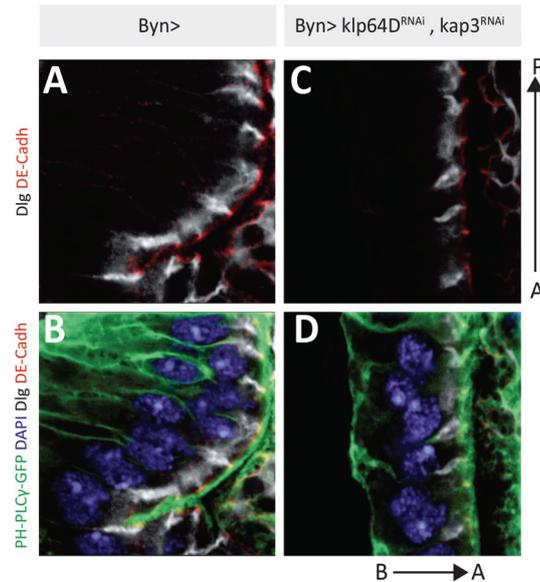


Figure 30. Localisation des jonctions adhérentes et du domaine baso-latéral des cellules épithéliales de l'hindgut adulte à 9h AFP

Distribution du marqueur baso-latéral (Dlg en blanc) et d'un marqueur associé aux jonctions adhérentes (DE-Cadhérine en rouge) dans les cellules d'hindguts adultes de génotypes : (A et B) *byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+* ou (C et D) *klp64D^{RNAi}, kap3^{RNAi/+}; byn::Gal4, UAS::PH-PLCγ-GFP/+*. La membrane des cellules est marquée par la GFP (vert) et l'ADN est marqué au DAPI (bleu). L'orientation par rapport à l'axe antéro-postérieur (A/P) est indiquée, de même que l'orientation de l'épithélium par rapport à l'axe apico-basal.

Nous avons vu que la mise en place de la polarité apico-basale était requise pour la rotation directionnelle du génitalia. Nous pourrions, dans un premier temps, déterminer l'effet de l'inactivation des gènes impliqués dans la polarité apico-basale sur l'enroulement de l'hindgut adulte. L'analyse de la localisation sub-cellulaire des composants du complexe PAR dans les cellules de l'hindgut adulte 9h AFP pourrait être envisagée secondairement.

Par ailleurs, l'extinction de l'activité de la Kinésine-2 dans l'ensemble de l'organisateur D/G telle qu'exposée précédemment ne permet pas de détecter de changement subtil dans la localisation ou la répartition des composants de la polarité apico-basale (Bazooka, Par6, aPKC) ou des jonctions adhérentes (DE-cadhérine, β-caténine). Nous pourrions effectuer une analyse clonale des conséquences de la perte de fonction de *klp64D* sur la polarité apico-basale et la localisation des jonctions adhérentes dans les cellules de l'hindgut adulte. Celle-ci pourrait être réalisée au moyen du système FLT/FRT, qui permet l'induction de clones somatiques dans le tissu d'intérêt (ici la zone de prolifération de l'hindgut adulte) grâce à l'utilisation d'une flipase (recombinase). Cette dernière agit en induisant la formation de recombinaisons homologues (*crossing over*) au niveau des sites FRT [247]. Les clones mutants sont marqués de manière cellule autonome par la GFP. L'avantage de ce système réside dans la possibilité de comparer directement des cellules

adjacentes mutantes et sauvages et donc de détecter des modifications mineures dans la localisation et l'expression des protéines.

3.6 *dapc1* n'interagit pas génétiquement avec *myoID*.

Les molécules APC constituent des protéines d'échafaudage pour le complexe de destruction ciblant la β -caténine et régulant l'adhésion cellulaire [248-252]. Il a été montré *in vitro* que la sous-unité Kap3 est capable de se lier au domaine ARD de dAPC1 (homologue d'Adenomatous Polyposis Coli chez la drosophile) ; dAPC1 interagissant ensuite avec dAPC2 [198]. Une étude réalisée sur des cellules MDCK en culture a montré que la sous-unité Kap3 de la Kinésine-2 est capable d'interagir avec APC. La β -caténine serait ainsi transportée par la Kinésine-2 le long du microtubule via son association avec APC [200]. Nous avons donc émis l'hypothèse que la Kinésine-2 pourrait contrôler le remodelage de la polarité cellulaire et des jonctions adhérentes dans les cellules MID- en s'associant à dAPC1. Nous avons donc voulu déterminer si les gènes *dapc1* et *dapc2* interagissaient avec *myoID* dans le génitalia. Pour cela, nous avons testé les allèles *apc1*^{Q8} et *apc2*³³ ainsi que le double mutant *apc1*^{Q8}, *apc2*³³ en contexte mutant *myoID*^{-/-} (Figure 31). Ces mutants n'induisent pas d'aggravation significative de la sinistralisation en contexte *myoID*^{-/-}. Les gènes *apc1* et *apc2* n'interagissent donc pas avec *myoID* ce qui infirme l'hypothèse d'une implication de dAPC1 dans l'asymétrie D/G.

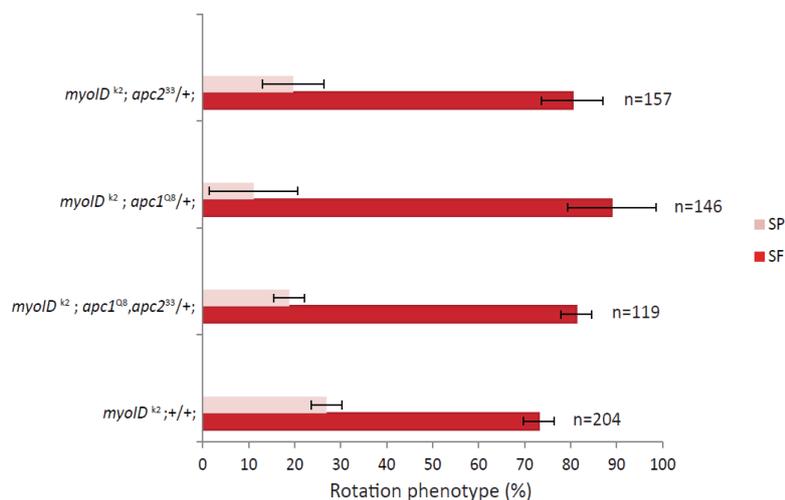


Figure 31. *dapc1* et *dapc2* n'interagissent pas avec *myoID*.

Les allèles mutants utilisés sont : l'allèle perte de fonction pour *myoID* (*myoID*^{k2}), l'allèle hypomorphe *apc2*³³, le mutant pour *apc1* (*apc1*^{Q8}) et le double mutant *apc1*^{Q8}, *apc2*³³. Le graphique montre le pourcentage de chaque classe de phénotype associé à la rotation du génitalia en contexte *myoID*^{-/-} (« SF » signifie *Sinistral Full* et « SP » *Sinistral Partial*). Les moyennes et les écarts types sont représentés.

3.7 Conclusion

Nous identifions ici trois nouveaux gènes interagissant avec *myoID* dans le segment A8 du disque génital : *lost*, *kfp64D* et *kfp68D*. Nous montrons plus particulièrement que la Kinésine-2 hétérotrimérique et MyoID sont requis de manière synchrone dans la voie dextrale au cours de la détermination D/G. De plus, la Kinésine-2 exerce un rôle non ciliaire dans la mise en place de l'axe D/G du génitalia et de l'*hindgut* adulte. Ce moteur microtubulaire serait requis dans les cellules qui n'expriment pas MyoID pour propager l'information directionnelle induite par MyoID. Nous montrons enfin que le rôle joué par la Kinésine-2 dans la détermination D/G ne repose pas sur un remodelage de la polarité apico-basale et des jonctions adhérentes.

Ces résultats mettent pour la première fois en lumière le rôle d'un moteur microtubulaire dans la détermination D/G chez les invertébrés. Cependant, de nouvelles investigations seraient nécessaires pour étudier le lien entre la fonction D/G de MyoID et l'activité de la Kinésine-2 dans les cellules MID-.

Quatrième partie : Discussion générale

1. Déterminant sinistral et fonction de MyoID dans la détermination D/G.

1.1 Recherche du déterminant sinistral et stratégie expérimentale.

Plusieurs approches expérimentales ont été élaborées pour identifier les partenaires fonctionnels de MyoID et mettre en évidence le déterminant sinistral qui reste encore à ce jour inconnu.

Un crible double hybride chez la levure a été réalisé afin d'identifier les partenaires capables d'interagir physiquement avec MyoID. Les cribles doubles hybrides présentent l'inconvénient de générer de nombreux faux positifs. Cette stratégie a néanmoins permis d'identifier la β -caténine comme partenaire fonctionnel interagissant physiquement avec MyoID [4]. En revanche cette stratégie pourrait ne pas être adaptée à la recherche du déterminant sinistral qui pourrait ne pas interagir physiquement avec MyoID.

Par ailleurs deux cribles génétiques modificateurs ont été mis en œuvre successivement dans différents contextes génétiques sensibilisés pour MyoID. Cette stratégie de sensibilisation permet de s'affranchir de la dominance du phénotype dextral sur le phénotype sinistral et donc d'isoler à la fois des activités sinistral et des activités dextrales. Le premier crible était basé sur le croisement de mouches *myoID*^{-/-} avec une collection de délétions génomiques couvrant les autosomes [137]. Il a permis de mettre en évidence le gène Hox *Abd-B* comme un régulateur de la détermination D/G en amont de MyoID. Le deuxième crible présenté dans cette thèse a été réalisé dans un contexte plus sensibilisé pour *myoID* (cf. Résultats section 2).

Ces cribles nous ont permis d'isoler de nouveaux acteurs de la voie dextrale et d'identifier *Abd-B* comme un régulateur majeur de la détermination D/G, aucune activité sinistrale n'a été isolée. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces difficultés à identifier le déterminant sinistral :

- L'activité sinistrale pourrait correspondre à un ou plusieurs loci dont la suppression induirait séparément des phénotypes en-dessous du seuil de détection fixé pour chaque crible.
- Le déterminant sinistral pourrait correspondre à une activité micro-ARN difficile à isoler dans le cadre d'un crible génétique utilisant des déficiences. Les microARN (miARNs) sont de petits ARN non codant qui régulent l'expression des gènes de manière post transcriptionnelle en s'appariant aux ARN messagers [253, 254]. Les miARNs sont impliqués dans l'asymétrie D/G neuronale chez *C. elegans* [255, 256] et dans l'asymétrie D/G viscérale chez le zebrafish [257]. Des investigations seraient nécessaires pour déterminer si la répression de l'asymétrie sinistrale par MyoID et la régulation spatio-temporelle de l'expression de MyoID lui-même pourraient reposer sur l'activité d'un ou plusieurs miARNs.
- Les deux cribles, en contexte sensibilisé pour *myoID*, étaient basés sur une évaluation de la rotation du génitalia mâle. Cependant une létalité liée à l'X peut être observée chez les mâles portant certaines déficiences du chromosome X délétant des gènes essentiels au développement. L'utilisation de l'enroulement stéréotypé de l'*hindgut* adulte, comme marqueur D/G chez la femelle, permettrait de cribler les gènes présents sur le chromosome X.

1.2 Modèles d'établissement de l'axe D/G chez la drosophile.

Afin d'expliquer l'existence de cette activité sinistrale récessive deux modèles peuvent être proposés : le modèle à *deux déterminants* et le modèle du *déterminant unique*.

Le modèle à *deux déterminants* constitue actuellement notre modèle de travail et repose sur la coexistence du déterminant dextral et du déterminant sinistral. Le déterminant dextral est dominant sur l'activité sinistrale. Ce modèle a été renforcé récemment par des données montrant que *Abd-B* contrôle l'expression de *myoID* et l'activité du déterminant sinistral. En effet, l'extinction du gène *Abd-B* en contexte sauvage pour *myoID* ou en contexte *myoID*^{-/-} conduit à un phénotype de non-rotation [137]. Chez les escargots, on retrouve cette dualité sinistral/dextral avec une dominance du déterminant dextral sur l'état sinistral chez *Lymnaea peregra* [258]. Chez ce gastéropode, l'injection du cytoplasme d'un œuf dextral dans un œuf sinistral conduit au développement d'un individu adulte dextral. En revanche l'injection du cytoplasme d'un œuf sinistral dans un œuf dextral ne modifie pas le *situs*. D'autres études menées chez *Laciniaria biplicata* [259] et *Partula suturalis* [260] montrent

comme chez *Lymnaea peregra* que l'asymétrie D/G est héritée maternellement. En revanche, chez *Laciniaria biplicata* [259] and *Partula suturalis* l'état sinistral est dominant sur l'état dextral. Dans ces deux cas aucune expérience d'échange de cytoplasme n'a été réalisée. De plus aucun des deux déterminants n'a été caractérisé moléculairement. Ces différentes études renforcent le modèle à *deux déterminants* car elles démontrent que, comme chez la drosophile, la détermination D/G repose sur la coexistence d'un déterminant dominant et d'un déterminant récessif. Par ailleurs, ces travaux montrent qu'un mécanisme alternatif également déterminé génétiquement est capable d'induire une brisure de symétrie en cas de défaillance du déterminant dominant. Dans le règne animal, la mise en place d'une asymétrie au cours du développement embryonnaire est en effet indispensable au positionnement et au fonctionnement correct des organes vitaux. Chez l'homme, le *situs inversus* est par exemple, dans la grande majorité des cas, asymptomatique sur le plan clinique alors que le *situs ambiguus* est accompagné de malformations graves pouvant mener à des avortements spontanés. En revanche chez la drosophile comme le montre notre étude, l'absence d'asymétrie n'induit pas de létalité. Au cours de l'évolution, la mise en place d'une asymétrie D/G stéréotypée semble donc avoir été renforcée par des mécanismes robustes et redondants (cet aspect sera abordé dans la section 5.2).

Le modèle du *déterminant unique* se fonde sur le postulat selon lequel l'asymétrie *inversus* sinistrale correspondrait à un état par défaut. Dans ce cas les cellules de l'organisateur D/G impliquées dans la brisure de symétrie ne seraient pas dans un état « naïf » (c'est à dire dépourvu d'information directionnelle) mais présenteraient une chiralité cytoplasmique intrinsèque. C'est l'expression de MyoID qui viendrait modifier cette chiralité. Ce modèle se heurte dès lors à un problème conceptuel majeur : comment expliquer l'existence d'un état symétrique (non rotation du génitalia ou linéarisation de l'*hindgut* embryonnaire) consécutif à l'extinction du gène *Abd-B* [137].

Des travaux récents ont été réalisés sur diverses lignées cellulaires issues de l'humain, du rat et de la souris [261]. Les auteurs ont ainsi étudié la chiralité de ces cellules mises en culture dans des microstructures. De manière intéressante, certaines lignées ont une plus forte propension à présenter un alignement dans le sens horaire, alors que l'alignement antihoraire est favorisé pour d'autres lignées. Les cellules squelettiques étudiées présentent un alignement antihoraire qui dépend de la fonctionnalité du cytosquelette d'actine mais pas des microtubules. Les cellules en culture sont donc capables d'adopter une orientation biaisée. Par ailleurs les auteurs montrent que l'orientation biaisée des cellules squelettiques dépend du

cytosquelette d'actine. Par conséquent, de façon similaire aux cellules du segment A8 qui expriment MyoID, les cellules en culture sont capables de générer une information D/G émanant du cytosquelette d'actine et de s'orienter par rapport aux deux autres « axes » (l' « axe » support de culture-milieu et l' « axe » constitué par le plan de la monocouche de cellules). Par ailleurs les auteurs montrent que l'utilisation d'inhibiteurs de l'actine entraîne l'inversion de la chiralité d'une lignée de cellules musculaires murines (C2C12). Il existe en outre dans ces cellules un mécanisme alternatif ne dépendant pas de l'actine, capable de briser la symétrie. Le mécanisme moléculaire qui mène à l'inversion de la chiralité dans les cellules en culture n'a pas été identifié mais il semble similaire à ce qui est observé *in vivo* chez la drosophile dans l'*hindgut* embryonnaire. En absence de MyoID, les cellules de l'*hindgut* embryonnaire présentent en effet un biais D/G inversé par rapport aux cellules de l'*hindgut* sauvage [139]. En revanche les travaux de Wan et col. ne permettent pas d'identifier le ou les déterminant(s) de la chiralité cellulaire. De même, ils ne permettent pas d'exclure l'implication des microtubules dans l'inversion de la chiralité induite lorsque la dynamique de l'actine est affectée.

Chez la drosophile, Abd-B intervient dans le contrôle de l'expression de MyoID (pour la démonstration on considérera uniquement l'activité du déterminant dextral MyoID). Le fait d'éteindre l'activité d'*Abd-B* entraîne un phénotype de non rotation très pénétrant [137]. Par conséquent, avant l'expression de MyoID l'état par défaut correspond à un état symétrique. Cet état perdure tant que MyoID n'a pas induit la brisure (il faut noter que l'expression de MyoID dans le segment A8, dans un contexte sensibilisé pour *Abd-B*, sauve le phénotype [137]). De fait, ces données montrent que l'état par défaut correspond à une absence d'asymétrie et non à une asymétrie sinistrale comme proposé par le modèle du *déterminant unique*. L'ensemble de ces données tendent donc à privilégier un modèle à *deux déterminants*. Il serait intéressant d'identifier les gènes régulés par Abd-B par séquençage haut débit en condition sauvage et en condition mutante pour *Abd-B*. De cette manière les gènes impliqués dans la voie sinistrale pourraient être identifiés d'un point de vue fonctionnel.

1.3 Fonction de MyoID dans la brisure de symétrie : hypothèses et perspectives

Actuellement le mécanisme cellulaire permettant à MyoID d'induire la brisure de symétrie et de générer une information directionnelle dans la cellule n'est pas connu. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la fonction cellulaire de MyoID dans l'asymétrie D/G [1]:

- Le transport actif et orienté de molécules impliquées dans la dextralisation (section 3.2.1).
- La génération d'un mouvement de force sur une protéine ou un complexe protéique relié à l'actine en utilisant l'énergie libérée par hydrolyse de l'ATP (section 3.2.2).
- La fonction d'ancrage de MyoID permettant le positionnement d'une molécule impliquée dans la dextralisation à un endroit précis de la cellule (section 3.2.2).

1.3.1 Fonction de transport de MyoID et détermination D/G

Les propriétés motrices de MyoID sont pour le moment inconnues tant au niveau de sa processivité, que de la directionnalité de son mouvement [1]. Des études *in vivo* et *in vitro* seraient nécessaires pour déterminer les propriétés motrices de MyoID et vérifier si ces propriétés jouent un rôle prépondérant dans la détermination D/G.

Néanmoins des expériences basées sur l'expression de constructions chimériques ont montré que la tête de myoID spécifie sa fonction dans la détermination D/G [262]. Le domaine *tête* est hautement conservé entre les myosines et contient le domaine moteur avec les sites de liaison à l'ATP et à l'actine [1]. En particulier Hozumi et col ont montré dans l'intestin embryonnaire que les domaines de liaison à l'ATP et les domaines de liaison à l'actine sont essentiels à la fonction de MyoID et MyoIC dans l'asymétrie D/G [136]. En revanche les domaines IQ, qui sont des sites de liaison pour la chaîne légère de myosine, sont uniquement requis pour la fonction de MyoID. Le domaine tête détermine également la spécificité d'organes des activités de MyoID et MyoIC [136].

1.3.2 Fonction d'ancrage de MyoID et régulation des propriétés mécaniques de la membrane

De manière intéressante, il a été récemment montré que le second messager lipidique PIP3 lie le domaine TH1 (situé dans la queue) des myosines ID, IE et IF chez *Dictyostelium discoideum* et permet leur recrutement à la membrane plasmique. Le recrutement de ces myosines de classe I par PIP3 favorise la chimiotaxie et induit la polymérisation de l'actine stimulée par les chémoattractants. Par conséquent chez *Dictyostelium discoideum* c'est la fonction d'ancrage de MyoID qui est mise en jeu et qui lui permet d'agir sur le cytosquelette d'actine [263, 264]. En outre, Nambiar et col. ont montré, chez les vertébrés, que les membres de la classe I des myosines (dont fait partie la myosine ID) sont capables de se lier à la membrane et ainsi d'assurer l'adhésion entre le cytosquelette d'actine et la membrane. De

cette manière, les myosines de classe I sont capables de contrôler directement la tension membranaire [265]. D'autres travaux réalisés *in vitro* montrent que MyoIC est capable de se lier à PIP2 et d'assurer la motilité des filaments d'actine [266]. De manière intéressante, cette motilité du filament d'actine se fait de manière invariante selon une trajectoire incurvée dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. Le domaine *queue* de MyoIC est requis pour l'attachement à la membrane mais pas pour la rotation anti-horaire du filament d'actine [266]. Enfin, les auteurs montrent que cette rotation directionnelle du filament d'actine n'est pas observée avec les myosines IA et IB. Ce qui montre que cette motilité antihoraire de l'actine est une spécificité de MyoIC. Il serait intéressant de tester de la même manière la motilité et le sens de rotation du filament d'actine associé à la myosine ID et à la myosine IC. Ceci permettrait d'établir un lien entre l'ancrage de MyoID et MyoIC à la membrane, la régulation du cytosquelette d'actine qui en découle et la fonction D/G de ces myosines chez la drosophile. Chez la drosophile, MyoID comme MyoIC possèdent un domaine PH qui est un site consensus d'interactions avec les phospho-inositides [1]. Ce site est situé dans le domaine *queue* de ces myosines. Deux mutations ponctuelles éliminant la fonction du domaine PH ont été réalisées au laboratoire pour chaque myosine [1]. Des résultats préliminaires montrent que l'expression de ces mutants dans l'organisateur D/G (segment A8) du génitalia induit un effet dominant négatif (phénotype très pénétrant de rotation dextrale incomplète) des constructions mutantes de MyoID. En revanche, l'expression des formes mutantes de MyoIC entraîne des phénotypes de rotation incomplète de faible pénétrance (20% Dextral Partiel au maximum) [1]. Ces résultats suggèrent que chez la drosophile, la fonction portée par le domaine PH de MyoID pourrait être requise pour la détermination D/G [1]. De même, il est possible que la fonction anti-dextralisante de MyoIC dépende également du domaine PH puisque les phénotypes obtenus lors de la sur-expression des mutants PH de MyoIC sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus lors de la sur-expression de la forme sauvage [1]. Ces données suggèrent que les fonctions D/G de MyoID et MyoIC chez la drosophile repose sur une interaction avec les phospholipides de la membrane via leur domaine PH.

L'ensemble de ces données ne permet pas de préciser la fonction cellulaire de MyoID dans l'asymétrie D/G. Des études complémentaires seront nécessaires pour étudier les caractéristiques biochimiques de MyoID relatives à l'exécution du mouvement, identifier les partenaires interagissant physiquement avec MyoID par des méthodes biochimiques et déterminer si la signalisation phospholipidique joue un rôle dans la détermination D/G. Ceci pourrait être réalisé en réduisant l'activité des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme et la signalisation des phospholipides.

1.4 Une latéralisation par étapes au sein de l'organisateur D/G

Nous montrons ici que le moteur microtubulaire Kinésine-2 est requis dans la détermination D/G de l'intestin adulte et du génitalia. L'extinction de l'activité des gènes codant pour les sous-unités de la Kinésine-2 a permis de montrer que la Kinésine-2 dans son ensemble est un acteur de la voie dextrale. En outre l'utilisation d'un système inductible thermosensible démontre que l'activité de *klp64D* est requise spécifiquement lors de la détermination D/G.

La mise en évidence de ces différents acteurs permet donc de différencier trois étapes (Figure 32) dans l'établissement de l'axe D/G et de préciser le rôle de l'organisateur D/G chez la drosophile:

1. **L'étape précoce pré-brisure** qui repose sur l'activité d'*Abd-B* et qui précède l'expression de MyoID [137]. On peut considérer qu'*Abd-B* fait indirectement partie du processus de brisure dès lors que sa suppression conduit à une perte d'asymétrie.
2. **L'étape de brisure de symétrie *per se*** qui fait intervenir MyoID [4] et qui génère une information directionnelle dans un sous-ensemble de cellules de l'organisateur D/G (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation). Les mécanismes cellulaires et moléculaires de brisure de symétrie impliquant MyoID n'ont, à ce jour, pas été élucidés mais semblent faire intervenir les jonctions adhérentes [138, 139].
3. **L'étape de propagation de l'information directionnelle** à l'ensemble des cellules de l'organisateur. Cette étape doit assurer le maintien et la robustesse de l'information directionnelle D/G quelque-soit la position des cellules dans l'organisateur.

Pour cela l'information doit être transmise dans un premier temps entre les cellules instruites par MyoID et les cellules adjacentes. Les jonctions adhérentes semblent jouer un rôle important dans ce processus aussi bien dans le génitalia que dans l'intestin embryonnaire [138, 139]. En effet, les jonctions adhérentes servent de plateforme signalétique pour la détermination D/G [34]. Par ailleurs la DE-Cadhérine agit en aval de MyoID au niveau du génitalia et de l'intestin embryonnaire pour contrôler la propagation de la brisure de symétrie et la morphogenèse asymétrique [34]. Par conséquent, la DE-cadhérine semble être requise pour la mise en place de l'axe D/G au niveau de différents organes asymétriques de la drosophile. De manière intéressante notre équipe a montré que la polarité planaire (PP) pourrait être requise dans l'étape de propagation de l'information directionnelle lors de la

mise en place de l'axe D/G dans l'intestin adulte (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation). Dans l'intestin adulte un mécanisme reposant sur la polarité planaire a en effet été proposé pour expliquer la transmission de l'information directionnelle des cellules qui expriment MyoID (MID+) aux cellules adjacentes MID- (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation). Des données préliminaires montrent en effet que MyoID est capable d'interagir physiquement avec la cadhérine atypique Dachous (Ds) dans les cellules MID+. C'est la signalisation Ds-Fat qui contribuerait ensuite à transmettre l'information directionnelle entre les cellules MID+ et les cellules MID- (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation). En revanche, la PP n'est pas impliquée dans la détermination D/G du génitalia [138] et de l'intestin embryonnaire [139]. Par conséquent la mise en jeu de la PP dans la morphogenèse asymétrique semble être une singularité de l'*hindgut* adulte.

L'information directionnelle doit ensuite être transmise de proche en proche à l'ensemble des cellules de l'organisateur. Cette étape nécessiterait le moteur microtubulaire kinesine-2 qui intervient donc dans les phases tardives de la détermination D/G. En effet, nous avons montré que l'activité de la Kinésine-2 est requise pendant la détermination D/G dans les cellules MID- aussi bien dans le segment A8 que dans l'*hindgut* adulte. Cette phase de propagation est indispensable à la mise en place de l'axe D/G puisque la perte de la kinesine-2 conduit à une perte d'asymétrie notamment dans l'intestin adulte. Afin de préciser la fonction cellulaire de la Kinésine-2, la localisation de chaque sous-unité du complexe devra être déterminée par immunomarquage dans les cellules du disque génital et de l'*hindgut* adulte. Ceci nécessitera la production d'anticorps monoclonaux spécifiques (nous avons produit des anticorps polyclonaux dirigés contre chaque sous-unité du complexe qui se sont avérés non spécifiques). Une stratégie alternative d'expression de l'homologue murin mKIF3A couplée à l'utilisation d'anticorps monoclonaux commerciaux dirigés contre KIF3A pourra également être envisagée. Ceci permettra d'observer la localisation sub-cellulaire de la Kinésine-2 et de déterminer par des méthodes biochimiques (co-immunoprécipitation) les partenaires interagissant physiquement avec la Kinésine-2.

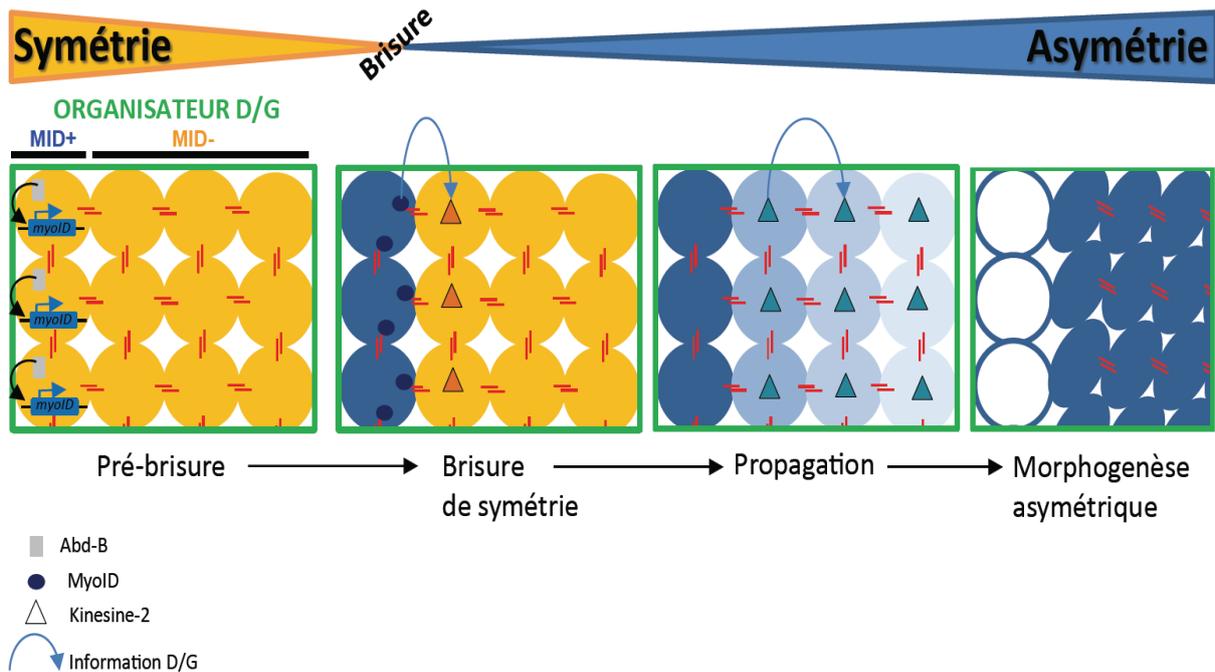


Figure 32. Modélisation de la mise en place de l'axe D/G chez la drosophile

Le modèle proposé permet de distinguer 4 étapes dans la mise en place de l'axe D/G : (1) le mécanisme de pré-brisure qui repose sur l'activité d'Abd-B qui contrôle l'expression de MyoID dans les cellules MID+ (pour des raisons de clarté, seuls les acteurs de la voie dextrale sont représentés). (2) L'évènement de brisure de symétrie *per se* qui met en jeu le déterminant dextral MyoID. MyoID interagit avec les jonctions adhérentes qui servent de plateforme signalétique pour la génération de l'information directionnelle D/G. (3) Cette information directionnelle doit être propagée de proche en proche entre les cellules MID- (qui n'expriment pas MyoID). Cette étape de propagation pourrait dépendre de la Kinésine-2 et des microtubules. (4) La mise en place de l'axe D/G aboutit à une morphogenèse asymétrique D/G.

2. Fonction des microtubules et de la Kinésine-2 dans la détermination D/G

2.1 Les microtubules dans l'asymétrie D/G

Notre étude suggère pour la première fois que les microtubules interviennent dans l'établissement de l'axe D/G chez la drosophile.

Chez *Arabidopsis Thaliana* des mutations dans la tubuline α et une protéine associée à la tubuline γ (Tubgcp2) influent sur les propriétés de symétrie des organes axiaux lors de leur croissance [267-269]. En effet, en condition sauvage, *A. Thaliana* ne présente pas de torsion lors de l'élongation normale et ses fleurs sont radialement symétriques. Cette symétrie peut être brisée par des mutations dans la tubuline et les complexes associés aux tubulines. Par

conséquent, chez *A. Thaliana* les microtubules permettent le maintien d'une croissance symétrique ; la brisure de symétrie n'intervenant qu'en condition mutante.

Maria Lobikin et col. ont montré que des mutations similaires à celles présentées précédemment chez *A. Thaliana* sont capables d'affecter les stades embryonnaires précoces de la détermination D/G chez *C. elegans* et le Xénope de même que la chiralité des cellules HL60 humaines en culture [270]. Chez le Xénope, cette étude suggère que ces mutations jouent un rôle dominant négatif dans l'asymétrie D/G très précocement au cours des premiers clivages embryonnaires. Ces données renforcent, selon les auteurs, le modèle *intracellulaire* car les microtubules sont requis dans la détermination D/G bien avant l'apparition des cils et du flux nodal. Par conséquent, chez les vertébrés, les microtubules peuvent jouer un rôle dans la mise en place de l'asymétrie D/G indépendamment des cils. En revanche ces travaux ne précisent pas chez le xénope, le rôle des microtubules et plus particulièrement des sites mutés dans la mise en place de l'asymétrie D/G précoce. Chez la drosophile, il serait intéressant d'étudier l'effet des mutations de la tubuline α sur la détermination D/G. Nous pourrions en particulier déterminer si l'expression de la tubuline α mutée dans le génitalia et l'hindgut adulte induit un effet dominant négatif et affecte la mise en place de l'axe D/G. Une autre étude a montré que le cytosquelette d'actine et dans une moindre mesure les microtubules sont impliqués dans la mise en place d'asymétries précoces dans l'embryon de xénope [62]. En revanche, cette dernière étude utilise des agents dépolymérisants de l'actine et des microtubules qui peuvent induire des effets non spécifiques. En outre, l'hétérotaxie observée après traitement présente une faible pénétrance (entre 5% et 19% selon le traitement). Ces études suggèrent donc que le cytosquelette d'actine et les microtubules contribuent à la mise en place précoce d'asymétrie D/G chez le Xénope mais ne permettent pas de caractériser la fonction cellulaire des microtubules dans l'asymétrie D/G précoce. De manière cohérente avec les données présentées précédemment, nous montrons chez la drosophile que les microtubules jouent un rôle non ciliaire dans la voie D/G dextrale. En revanche il n'est pas possible d'exclure pour le moment une implication des microtubules dans la voie sinistrale indépendamment de la Kinésine-2. Par conséquent l'ensemble de ces données révèlent que la contribution non ciliaire des microtubules dans l'asymétrie D/G apparaît bien conservée dans les différents règnes du vivant.

2.2 Fonction cellulaire de la Kinésine-2 dans la détermination D/G : nouvelles hypothèses et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de faire émerger de nouvelles hypothèses non exclusives pour expliquer la fonction cellulaire de la Kinésine-2 dans la propagation de l'information directionnelle induite par MyoID.

2.2.1 Kinésine-2 et polarité planaire

Nous avons montré que la chiralité des cellules de l'*hindgut* adulte qui n'expriment pas MyoID (que l'on appellera MID-) dépend de la Kinésine-2. La Kinésine-2 ne semble pas requise pour le remodelage des jonctions adhérentes et de la polarité apico-basale au cours de la morphogenèse asymétrique. En outre notre équipe a mis en évidence le rôle de la signalisation Ds-Fat de la polarité planaire dans l'établissement de la chiralité des cellules MID- qui détermine le sens d'enroulement de l'*hindgut* adulte (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation). Chez les vertébrés, la Kinésine-2 est impliquée dans la mise en place de la polarité planaire dans les cellules auditives ciliées [199] et joue un rôle non ciliaire dans la signalisation dépendante de Disheveled [205]. Ce dernier est un régulateur important de la voie de signalisation canonique Wnt et de la polarité planaire. Enfin, une autre étude permet de faire le lien entre la fonction de KIF3A et la régulation de la polarité planaire des cellules ciliées chez la souris sans qu'il soit possible de déterminer si les phénotypes observés sont dus à la fonction ciliaire ou à la fonction non ciliaire (ou les deux) de KIF3A [271].

Par conséquent, ces données suggèrent que chez la drosophile, la Kinésine-2 pourrait être impliquée dans le remodelage de la polarité planaire lors de la morphogenèse D/G. Pour vérifier cette hypothèse il serait d'abord intéressant de déterminer si les gènes impliqués dans la polarité planaire interagissent génétiquement avec *klp64D* et *myoID* dans l'*hindgut* adulte. Ces interactions pourront être évaluées en plaçant les mutants des gènes du système DS (*fat*, *four jointed dachsous*) et du système STAN (*strabismus*, *frizzled2*, *prickle*, *flamingo*, *diego*, *frizzled* et *dishevelled*) en condition sensibilisée pour *myoID* et *klp64D*. Le sens d'enroulement de l'*hindgut* adulte sera ensuite évalué. En cas d'interaction génétique, nous procéderons à l'étude des interactions physiques des acteurs de la polarité planaire avec Klp64D par co-immunoprécipitation.

2.2.2 Kinésine-2 et polarité des microtubules

La deuxième hypothèse permettant d'expliquer le rôle de la Kinésine-2 dans la détermination D/G est basée sur le contrôle par la Kinésine-2 de la polarité des microtubules. Nous avons montré que la Kinésine-2 joue un rôle dans l'acquisition de la chiralité planaire des cellules de l'*hindgut* adulte. Chez la drosophile, la Kinésine-2 régule la polarité des microtubules dans les dendrites [198]. Les auteurs suggèrent que la Kinésine-2 serait recrutée à l'extrémité + des microtubules en croissance et les dirigerait jusqu'au point de branchement. Dans les neurites, dAPC1 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la polarité des microtubules et le recrutement de la Kinésine-2 à l'extrémité + des microtubules [198]. Cependant, nous avons montré que *Dapc1* n'interagissait pas avec *myoID* dans le génitalia (cf. Résultats section 3.6). Néanmoins, Klp68D contient un motif SxIP qui pourrait contribuer à l'interaction physique directe entre EB1 et Klp68D [198, 272]. Honnappa et col. ont en effet montré sur des cellules en culture que le court motif Ser-x-Ile-Pro (SxIP) contribue à la localisation, à l'extrémité + des microtubules, de plusieurs protéines telles que APC, STIM1 (protéine transmembranaire) ou la kinésine MCAK. Les auteurs montrent que ce ciblage à l'extrémité + des microtubules par l'intermédiaire du motif SxIP est dépendant d'EB1 [272]. Une autre étude récente réalisée sur les cellules en culture MDCK montre que KIF3A contrôle la dynamique et la directionnalité des microtubules au niveau du front de migration influençant ainsi la migration cellulaire et la morphogenèse épithéliale [202]. Par conséquent, la Kinésine-2 est capable de diriger et d'orienter l'extrémité + des microtubules dans les cellules en culture [202] comme chez la drosophile [198]. Or, des travaux récents réalisés chez la drosophile montrent que l'orientation des extrémités + des microtubules détermine la direction de rotation de la chambre d'œuf ovarienne [222]. En effet, l'élongation de la chambre d'œuf implique une rotation globale de l'épithélium folliculaire le long de l'axe antéro-postérieur. La rotation de chaque chambre d'œuf dans le sens horaire ou anti-horaire dépend de la polarisation des microtubules. Ces résultats montrent donc que chez la drosophile l'organisation polarisée des microtubules peut jouer un rôle dans la morphogenèse chirale. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que la Kinésine-2 pourrait remodeler l'orientation des extrémités + des microtubules et ainsi contrôler la chiralité des cellules MID-.

Afin de vérifier cette hypothèse nous déterminerons d'abord si la propagation de l'information directionnelle initiée par MyoID implique un remodelage de la polarité des microtubules. Pour ce faire, nous déterminerons s'il existe un lien entre la chiralité des

cellules MID- de l'*hindgut* adulte et l'orientation des microtubules en utilisant la construction Ubi-Eb1::GFP (construction s'exprimant constitutivement sous contrôle du promoteur endogène) [273]. EB1 est une protéine hautement conservée qui se fixe à l'extrémité + des microtubules en polymérisation *in vivo* [274]. Elle interagit directement avec d'autres protéines ou complexes protéiques (dont la Kinésine-2 [198]) se liant à l'extrémité +. La construction EB1::GFP permet d'orienter les microtubules, de détecter les extrémités + et apparaît sous la forme de « comètes ». Il est alors possible de calculer l'angle entre la « comète » et l'axe A/P [222]. Nous comparerons par cette technique, l'orientation des microtubules en condition sauvage et en condition *myoID^{-/-}* au stade larvaire L3 (avant l'apparition du biais D/G) et à 9 H après formation de la puppe (AFP). Nous déterminerons ensuite si la Kinésine-2 joue un rôle dans le remodelage de la polarité des microtubules. Pour ce faire nous comparerons l'orientation des microtubules en condition sauvage et après extinction de l'activité de la Kinésine-2 à 9h APF.

3. La Kinésine-2, un lien évolutif entre vertébrés et drosophile ?

Le rôle ciliaire de la Kinésine-2 dans la mise en place de l'axe D/G des vertébrés est largement documenté notamment chez la souris (voir Introduction chapitre 1 section 2.1.1). En revanche très peu de données indiquent que ce moteur pourrait jouer un rôle cytoplasmique dans l'asymétrie D/G. Pour le moment, les deux fonctions ciliaire/cytoplasmique de la Kinésine-2 ne peuvent pas être différenciées chez la souris. De manière intéressante une dualité fonctionnelle ciliaire/non ciliaire dans la détermination D/G a été démontrée pour la Left-Right Dynéine (LRD) [19, 72]. En effet, la LRD joue un rôle essentiel dans la détermination D/G pour le mouvement des cils et la génération du flux nodal [19] mais elle est également requise indépendamment des cils dans la ségrégation sélective des chromatides qui est importante pour l'établissement de l'asymétrie D/G viscérale [71, 72]. Il serait ainsi intéressant de vérifier si les dynéines sont impliquées dans la détermination D/G chez la drosophile. On pourrait ainsi déterminer, dans le segment A8, si l'inactivation des gènes codant pour les dynéines de la drosophile induit des défauts de rotation. En outre, Qiu et col. ont détecté la sous-unité KIF3B uniquement du côté droit du nœud de Hensen dans l'embryon précoce de poulet [62]. Les auteurs ont suggéré que KIF3B pourrait jouer un rôle cytoplasmique dans la détermination D/G mais les mécanismes mis en jeu n'ont pas été

élucidés. Enfin, si plusieurs études ont montré l'existence d'une dualité fonctionnelle ciliaire/non ciliaire de la Kinésine-2, aucun lien n'a été établi avec l'asymétrie D/G [199, 205].

On peut dès lors se demander si la fonction D/G non ciliaire des moteurs LRD et Kinésine-2 ne correspondrait pas à une fonction D/G ancestrale qui aurait pu être conservée au cours de l'évolution. Il est d'ailleurs intéressant de constater que la machinerie de transport intraflagellaire dont fait partie la Kinésine-2 dérive du système de transport intracellulaire [275]. En effet, l'acquisition des cils est considérée comme un évènement relativement tardif dans l'histoire évolutive des eucaryotes. Un scénario évolutif propose ainsi que le transport intraflagellaire dériverait du processus de transport intracellulaire bidirectionnel des vésicules (recouvertes d'un manteau) opérant entre la membrane plasmique et l'appareil de Golgi [276]. Par ailleurs les analyses phylogénétiques montrent qu'il existe une forte homologie entre les sous-unités motrices de la Kinésine-2 si on compare les vertébrés et la drosophile (voir Introduction chapitre 2 section 2). Cette homologie est particulièrement marquée entre Klp64D (drosophile) et HsKIF3A (humain). Chez la drosophile, de manière intéressante, l'expression de l'homologue murin mKIF3A est capable de sauver les phénotypes mutants de *kfp64D* dans les photorécepteurs [172] et les cellules neuronales ciliées [234]. L'expression de mKIF3A est également capable de sauver la létalité générée par les mutants de *kfp64D* en condition homozygote [181]. Ceci montre que la sous-unité mKIF3A est capable de se substituer fonctionnellement à Klp64D [172, 181, 234]. Ces données renforcent l'idée selon laquelle la fonction D/G de la Kinésine-2 aurait évolué en parallèle à l'apparition des cils. L'étude présentée dans cette thèse suggère pour la première fois que la fonction D/G de la Kinésine-2 pourrait avoir évolué d'une fonction D/G cytoplasmique chez la drosophile vers une spécialisation et une compartimentalisation fonctionnelle chez les vertébrés. Par ailleurs, chez les vertébrés, on ne peut pas exclure que la Kinésine-2 comme LRD exerce également, dans la détermination D/G, un rôle cytoplasmique, qui est à caractériser. Afin de démontrer l'homologie fonctionnelle entre Klp64D et mKIF3A dans l'asymétrie D/G, nous pourrions déterminer si l'expression de l'homologue mKIF3A est capable de sauver les phénotypes D/G induits par la réduction de l'activité de *kfp64D*. Ce sauvetage phénotypique serait réalisé dans l'intestin adulte qui a l'avantage de présenter des phénotypes très pénétrants dans un contexte fortement sensibilisé pour *kfp64D* (en couplant le RNAi ciblant *kfp64D* et l'allèle KLP64D^{A8.n123}) et de permettre l'analyse de la chiralité des cellules.

4. *Modèle intracellulaire vs modèle ciliaire : un consensus est-il possible ?*

La mise en évidence chez la drosophile d'un rôle non ciliaire de la Kinésine-2 et des microtubules dans la détermination D/G nous incite à ne plus envisager les mécanismes de détermination D/G sous la forme d'une opposition modèle intracellulaire/modèle ciliaire, actines/microtubules. Nous proposons ici d'avoir une approche séquentielle de l'asymétrie D/G selon trois principes :

- La détermination D/G repose sur un enchaînement d'évènements permettant de générer puis de transmettre une information directionnelle.
- La latéralisation D/G pourrait faire intervenir des mécanismes de redondance.
- La brisure de symétrie et la propagation sont deux étapes distinctes et indispensables à la mise en place de l'axe D/G.

4.1 Une vision séquentielle de la détermination D/G

Comme énoncé par Brown et Wolpert il y a 23 ans, la détermination D/G repose sur une succession d'évènements convertissant une asymétrie au niveau moléculaire en une asymétrie au niveau cellulaire puis tissulaire [7]. Les données accumulées depuis, dans les différents organismes modèles, ont conforté ce principe. L'axe D/G semble être établi très précocement au cours de l'embryogenèse dans la plupart des organismes [9] que ce soit chez les invertébrés (asymétrie au niveau de l'intestin embryonnaire chez la drosophile, orientation du clivage chez l'escargot, disposition asymétrique des blastomères chez *C. elegans*) ou chez les vertébrés (flux ioniques latéralisés précoces chez le poulet, le xénope, zebrafish et l'oursin) [9].

Un mécanisme de latéralisation plus tardif est mis en jeu au cours de la gastrulation par le biais du flux nodal (chez le zébrafish, lapin, xénope, la souris) qui induit une expression latéralisée de certains gènes [8]. Chez les invertébrés la transmission de l'information directionnelle pourrait faire intervenir la polarité planaire (drosophile et *C.elegans*). Néanmoins, les données disponibles actuellement ne permettent pas d'établir un lien clair entre les asymétries précoces (flux ioniques chez les vertébrés, asymétrie de l'intestin embryonnaire de la drosophile) et les mécanismes D/G tardifs (flux nodal chez les vertébrés

ou rotation du génitalia/enroulement de l'*hindgut* chez la drosophile). Par conséquent dans le monde animal, l'asymétrie D/G semble s'établir par palier selon un mode séquentiel.

4.2 Mécanismes D/G et redondance

Cette apparente indépendance entre asymétries précoces et asymétries plus tardives nous amène à évoquer l'existence de mécanismes de redondance dans la détermination D/G. Le modèle *ciliaire* comme le modèle *intracellulaire* ne répondent pas aux deux questions fondamentales : La symétrie est-elle brisée à différents moments et en différents endroits ? Existe-t-il des mécanismes de « re-brisure » ? En particulier doit-on considérer la latéralisation dépendante du flux nodal comme une étape de re-brisure ou comme une étape de propagation et d'amplification de l'asymétrie comme le suggère le modèle *intracellulaire* [2].

Chez la drosophile, il est bien établi que les asymétries des différents organes se mettent en place de manière indépendante au sein d'organiseurs D/G distincts. C'est le cas entre l'intestin adulte et l'intestin embryonnaire ou entre le génitalia et les testicules [114]. L'équipe a montré que MyoID contrôle la mise en place de l'axe D/G dans le segment A8 (organiseur D/G) du génitalia et dans la zone de prolifération (organiseur D/G de l'*hindgut*) de manière indépendante (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation). La mise en place de l'asymétrie dextrale semble faire intervenir des mécanismes différents dans l'étape de propagation du biais D/G (intervention de la polarité planaire dans l'*hindgut* adulte (Nicanor Gonzalez-Morales, communication personnelle – article en préparation) mais pas dans l'intestin embryonnaire [139] ou le génitalia [138]). Le modèle de l'*hindgut* chez la drosophile est intéressant car il permet de discriminer plusieurs séquences : (I) asymétrie précoce embryonnaire (II) « re-brisure » dans l'intestin adulte (III) propagation de l'information directionnelle et morphogenèse asymétrique. En outre, chez la drosophile, comme chez l'escargot la coexistence de deux déterminants peut également s'apparenter à un mécanisme de redondance.

La question de la redondance est une question fondamentale pour construire un modèle qui prenne en compte les contributions des différents mécanismes D/G et comprendre, en particulier chez les vertébrés, comment est relayée l'information D/G depuis les stades embryonnaires précoces jusqu'à la morphogenèse asymétrique des organes adultes.

4.3 L'organisateur D/G a-t-il évolué fonctionnellement ?

Cette notion de redondance nous amène également à nous demander si la fonction de l'organisateur D/G a évolué entre les invertébrés et les vertébrés. Nous l'avons vu, chez les invertébrés et notamment chez la drosophile et l'escargot (*Lymnaea peregra* [258], *Laciniaria biplicata* [259] et *Partula suturalis* [260]), l'ensemble des étapes menant à l'établissement de l'axe D/G a lieu au sein d'un ou de plusieurs organisateurs D/G.

Chez le xénope, Vandenberg et col. [277] ont étudié la relation entre l'établissement de l'asymétrie D/G et l'apparition de l'organisateur au cours du développement. Ils souhaitaient déterminer si la spécification de l'axe D/G était indépendante de l'organisateur D/G (plafond du gastrocoele équivalent du noeud chez le Xénope). Les irradiations aux ultraviolets empêchent la formation de l'axe dorso-ventral chez l'embryon du xénope [278, 279]. La mise en place de cet axe peut être sauvée par des méthodes physiques [280], ou plus tardivement au cours du développement par l'injection de composants de l'organisateur de Spemann's (ARNm *Siamois*) ou par des méthodes chimiques [281-284]. De cette manière, il est possible de déterminer à quel moment, l'organisateur est capable de coordonner les trois axes : A/P, D/V et D/G. Les embryons de xénope irradiés, dont le sauvetage mécanique de l'axe D/V a lieu au stade 1-cellule, ne présentent pas de défaut d'établissement de l'axe D/G. En revanche, les embryons irradiés, pour qui le sauvetage a lieu au stade gastrula, présentent un *situs* aléatoire [277]. Par conséquent l'induction au stade gastrula de l'organisateur permet la mise en place correcte des axes D/V et A/P mais pas de l'axe D/G. Ces expériences suggèrent, chez le xénope, que les premiers clivages embryonnaires jouent un rôle important pour la mise en place plus tardive de l'axe D/G par l'organisateur. Cependant ces expériences ne permettent pas de conclure définitivement sur la dépendance entre les mécanismes de brisure précoce et la contribution de l'organisateur D/G. En effet, des approches expérimentales très différentes sont utilisées pour réaliser le sauvetage phénotypique : le sauvetage précoce est induit par un moyen mécanique entraînant la rotation corticale alors que le sauvetage tardif repose sur l'injection de l'ARNm de *Siamois* qui est un composant de l'organisateur de Spemann. Les différences de *situs* observées suite au sauvetage par ces deux méthodes différentes (mécanique vs injection de *Siamois*) pourraient être attribuées à un effet de dosage. En effet l'induction mécanique de la rotation corticale induit une signalisation stable et constante (facteurs de signalisation induits à des niveaux optimaux). En revanche l'injection de *Siamois* est soumise à des aléas (livraison variable de l'ARNm à l'embryon) et

donc à des fluctuations du dosage. Ainsi ces fluctuations peuvent affecter la formation et la fonctionnalité de l'organisateur sans empêcher la spécification correcte des axes A/P et D/V.

Les travaux de Vandenberg et col. posent donc la question de la dépendance relative des mécanismes D/G tardifs (au stade gastrula) par rapport aux asymétries précoces. Chez les vertébrés, les travaux présentés ci-dessus suggèrent que la fonction de l'organisateur dans la détermination D/G dépend d'évènements précoces au cours du développement embryonnaire. Ces évènements pourraient reposer sur une morphogenèse chirale dépendant du cytosquelette d'actine et des microtubules puisque comme nous l'avons abordé précédemment (section 2.2), chez le xénope, l'actine et les microtubules semblent jouer un rôle (qui reste à définir) dans l'établissement des asymétries précoces [62, 270]. Des études complémentaires seront nécessaires chez les vertébrés pour :

- Caractériser la contribution de l'actine et des microtubules dans la morphogenèse chirale précoce. Il serait en particulier intéressant de déterminer si MyoID et la Kinésine-2 jouent un rôle D/G dans les étapes précoces. Des résultats préliminaires obtenus chez le xénope et le zebrafish (collaborations en cours) suggèrent d'ailleurs que MyoID pourrait être impliqué dans la détermination D/G chez les vertébrés.
- Démontrer l'indépendance spatiale (brisure de symétrie initiale en dehors de l'organisateur) et temporelle (brisure antérieure à la formation de l'organisateur) de la brisure par rapport à l'organisateur D/G. Des travaux complémentaires à ceux de Vandenberg et col. pourraient être envisagés pour démontrer que le sauvetage tardif de l'organisateur D/G par injection d'ARNm induit un organisateur pleinement fonctionnel capable de spécifier les trois axes. Ceci nécessiterait notamment d'étudier la morphologie du plafond du gastrocoèle et de déterminer si la ciliogenèse et l'expression asymétrique du gène *Coco* sont similaires aux embryons n'ayant pas subi de traitement UV.

Conclusion

L'étude présentée ici a permis d'identifier un nouvel acteur de la voie dextrale et d'envisager pour la première fois une contribution du cytosquelette microtubulaire dans l'établissement de l'axe D/G chez la drosophile. Nos travaux permettent également de préciser les différentes étapes aboutissant à l'établissement de l'axe D/G : (i) la pré-brisure impliquant le facteur de transcription Abd-B (ii) l'évènement de brisure mettant en jeu la myosine non conventionnelle de type ID, les jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine (iii) la propagation de l'information directionnelle nécessitant la Kinésine-2.

D'une manière générale, les fonctions cellulaires exercées par la Kinésine-2 chez la drosophile restent peu connues. Nous avons montré que la polarisation acquise par les cellules dans le plan de l'épithélium de l'*hindgut* adulte dépend de la Kinésine-2. Lors de la morphogenèse asymétrique, la Kinésine-2 pourrait être impliquée dans le remodelage de la polarité des microtubules et/ou l'établissement de la polarité planaire. L'observation de la localisation sub-cellulaire de la Kinésine-2 au moyen d'anticorps spécifiques pourrait également permettre de préciser sa fonction cellulaire.

La Kinésine-2 étant impliquée dans la détermination D/G chez les vertébrés, nos résultats suggèrent l'existence d'un lien évolutif entre la drosophile et les vertébrés. D'autre part, ces résultats permettent d'envisager une contribution non ciliaire de la Kinésine-2 dans la détermination D/G. Pour le moment seul le modèle de la drosophile permet d'étudier la fonction cytoplasmique D/G de la Kinésine-2.

Même si les mécanismes d'établissement de l'axe D/G commencent à être mieux connus, les travaux récents ont fait émerger de nouveaux concepts et de nouvelles questions :

- Les protéines « ciliaires » jouent-elles un rôle cytoplasmique dans la mise en place de l'axe D/G chez les vertébrés ?
- Certains mécanismes cellulaires mis en jeu lors de la détermination D/G sont-ils conservés entre les vertébrés et la drosophile ?

- Comment a évolué la fonction de l'organisateur D/G entre les invertébrés et les vertébrés ?
- Qu'elle est la contribution des asymétries précoces et des mécanismes tardifs dans la morphogenèse asymétrique ?

Bibliographie

1. Spéder, P., *Asymétrie Droite-Gauche chez la Drosophile-Etude d'un mutant Situs inversus* 2007, Nice Sophia-Antipolis.
2. Vandenberg, L.N. and M. Levin, *A unified model for left-right asymmetry? Comparison and synthesis of molecular models of embryonic laterality*. Dev Biol, 2013. **379**(1): p. 1-15.
3. Morgan, D., et al., *Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the inv mouse*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 149-56.
4. Speder, P., G. Adam, and S. Noselli, *Type II unconventional myosin controls left-right asymmetry in Drosophila*. Nature, 2006. **440**(7085): p. 803-7.
5. Hamada, H., et al., *Establishment of vertebrate left-right asymmetry*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(2): p. 103-13.
6. Lenhart, K.F., et al., *Integration of nodal and BMP signals in the heart requires FoxH1 to create left-right differences in cell migration rates that direct cardiac asymmetry*. PLoS Genet, 2013. **9**(1): p. e1003109.
7. Brown, N.A. and L. Wolpert, *The development of handedness in left/right asymmetry*. Development, 1990. **109**(1): p. 1-9.
8. Nakamura, T. and H. Hamada, *Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms*. Development, 2012. **139**(18): p. 3257-62.
9. Speder, P., et al., *Strategies to establish left/right asymmetry in vertebrates and invertebrates*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(4): p. 351-8.
10. Basu, B. and M. Brueckner, *Cilia multifunctional organelles at the center of vertebrate left-right asymmetry*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 151-74.
11. Marszalek, J.R., et al., *Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5043-8.
12. Takeda, S., et al., *Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A^{-/-} mice analysis*. J Cell Biol, 1999. **145**(4): p. 825-36.
13. Nonaka, S., et al., *Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein*. Cell, 1998. **95**(6): p. 829-37.
14. Hirokawa, N., et al., *Nodal flow and the generation of left-right asymmetry*. Cell, 2006. **125**(1): p. 33-45.
15. Scholey, J.M., *Intraflagellar transport*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 423-43.
16. Sloboda, R.D. and J.L. Rosenbaum, *Making sense of cilia and flagella*. J Cell Biol, 2007. **179**(4): p. 575-82.
17. Hirokawa, N., Y. Tanaka, and Y. Okada, *Cilia, KIF3 molecular motor and nodal flow*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(1): p. 31-9.
18. Okada, Y., et al., *Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 459-68.
19. Supp, D.M., et al., *Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries*. Development, 1999. **126**(23): p. 5495-504.

20. Nonaka, S., et al., *Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 96-9.
21. Schweickert, A., et al., *Cilia-driven leftward flow determines laterality in Xenopus*. Curr Biol, 2007. **17**(1): p. 60-6.
22. Okada, Y., et al., *Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination*. Cell, 2005. **121**(4): p. 633-44.
23. Essner, J.J., et al., *Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut*. Development, 2005. **132**(6): p. 1247-60.
24. Kramer-Zucker, A.G., et al., *Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis*. Development, 2005. **132**(8): p. 1907-21.
25. Drummond, I.A., *Cilia functions in development*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(1): p. 24-30.
26. Babu, D. and S. Roy, *Left-right asymmetry: cilia stir up new surprises in the node*. Open Biol, 2013. **3**(5): p. 130052.
27. Caspary, T., C.E. Larkins, and K.V. Anderson, *The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture*. Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 767-78.
28. Afzelius, B.A., *Asymmetry of cilia and of mice and men*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(4): p. 283-6.
29. Nonaka, S., et al., *De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia*. PLoS Biol, 2005. **3**(8): p. e268.
30. Shiratori, H. and H. Hamada, *The left-right axis in the mouse: from origin to morphology*. Development, 2006. **133**(11): p. 2095-104.
31. Shinohara, K., et al., *Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 622.
32. Cartwright, J.H., O. Piro, and I. Tuval, *Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7234-9.
33. McGrath, J., et al., *Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse*. Cell, 2003. **114**(1): p. 61-73.
34. Pennekamp, P., et al., *The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice*. Curr Biol, 2002. **12**(11): p. 938-43.
35. Field, S., et al., *Pkd1l1 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2*. Development, 2011. **138**(6): p. 1131-42.
36. Norris, D.P. and D.T. Grimes, *Developmental biology. Cilia discern left from right*. Science, 2012. **338**(6104): p. 206-7.
37. Marques, S., et al., *The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis*. Genes Dev, 2004. **18**(19): p. 2342-7.
38. Oki, S., et al., *Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo*. Development, 2007. **134**(21): p. 3893-904.
39. Kawasumi, A., et al., *Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into left-right asymmetry in the lateral plate of mouse embryos*. Dev Biol, 2011. **353**(2): p. 321-30.
40. Schweickert, A., et al., *The nodal inhibitor Coco is a critical target of leftward flow in Xenopus*. Curr Biol, 2010. **20**(8): p. 738-43.
41. Carneiro, K., et al., *Histone deacetylase activity is necessary for left-right patterning during vertebrate development*. BMC Dev Biol, 2011. **11**: p. 29.

42. Nakamura, T., et al., *Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 495-504.
43. Marjoram, L. and C. Wright, *Rapid differential transport of Nodal and Lefty on sulfated proteoglycan-rich extracellular matrix regulates left-right asymmetry in Xenopus*. Development, 2011. **138**(3): p. 475-85.
44. Shiratori, H., et al., *Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs*. Development, 2006. **133**(15): p. 3015-25.
45. Vandenberg, L.N. and M. Levin, *Far from solved: a perspective on what we know about early mechanisms of left-right asymmetry*. Dev Dyn, 2010. **239**(12): p. 3131-46.
46. Tian, T., et al., *Both foxj1a and foxj1b are implicated in left-right asymmetric development in zebrafish embryos*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(3): p. 537-42.
47. Kishimoto, N., et al., *Cystic kidney gene seahorse regulates cilia-mediated processes and Wnt pathways*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 954-61.
48. Zhao, C. and J. Malicki, *Genetic defects of pronephric cilia in zebrafish*. Mech Dev, 2007. **124**(7-8): p. 605-16.
49. Zeng, H., A.N. Hoover, and A. Liu, *PCP effector gene Inturned is an important regulator of cilia formation and embryonic development in mammals*. Dev Biol, 2010. **339**(2): p. 418-28.
50. Valente, E.M., et al., *Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes*. Nat Genet, 2010. **42**(7): p. 619-25.
51. Gros, J., et al., *Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick*. Science, 2009. **324**(5929): p. 941-4.
52. Davis, N.M., et al., *The chirality of gut rotation derives from left-right asymmetric changes in the architecture of the dorsal mesentery*. Dev Cell, 2008. **15**(1): p. 134-45.
53. Savin, T., et al., *On the growth and form of the gut*. Nature, 2011. **476**(7358): p. 57-62.
54. Heacock, A.M. and B.W. Agranoff, *Clockwise growth of neurites from retinal explants*. Science, 1977. **198**(4312): p. 64-6.
55. Mendelson, N.H., *Helical growth of Bacillus subtilis: a new model of cell growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(5): p. 1740-4.
56. Xu, J., et al., *Polarity reveals intrinsic cell chirality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9296-300.
57. Danilchik, M.V., E.E. Brown, and K. Riegert, *Intrinsic chiral properties of the Xenopus egg cortex: an early indicator of left-right asymmetry?* Development, 2006. **133**(22): p. 4517-26.
58. Gardner, R.L., *Normal bias in the direction of fetal rotation depends on blastomere composition during early cleavage in the mouse*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9610.
59. Levin, M. and M. Mercola, *Gap junctions are involved in the early generation of left-right asymmetry*. Dev Biol, 1998. **203**(1): p. 90-105.
60. Klar, A.J., *A model for specification of the left-right axis in vertebrates*. Trends Genet, 1994. **10**(11): p. 392-6.
61. Aw, S. and M. Levin, *Is left-right asymmetry a form of planar cell polarity?* Development, 2009. **136**(3): p. 355-66.
62. Qiu, D., et al., *Localization and loss-of-function implicates ciliary proteins in early, cytoplasmic roles in left-right asymmetry*. Dev Dyn, 2005. **234**(1): p. 176-89.
63. Kramer, K.L., J.E. Barnette, and H.J. Yost, *PKCgamma regulates syndecan-2 inside-out signaling during xenopus left-right development*. Cell, 2002. **111**(7): p. 981-90.
64. Fukumoto, T., R. Blakely, and M. Levin, *Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos*. Dev Neurosci, 2005. **27**(6): p. 349-63.

65. Aw, S., et al., *H,K-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry*. *Mech Dev*, 2008. **125**(3-4): p. 353-72.
66. Adams, D.S., et al., *Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates*. *Development*, 2006. **133**(9): p. 1657-71.
67. Morokuma, J., D. Blackiston, and M. Levin, *KCNQ1 and KCNE1 K⁺ channel components are involved in early left-right patterning in *Xenopus laevis* embryos*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. **21**(5-6): p. 357-72.
68. Fukumoto, T., I.P. Kema, and M. Levin, *Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos*. *Curr Biol*, 2005. **15**(9): p. 794-803.
69. Nogi, T. and M. Levin, *Characterization of innexin gene expression and functional roles of gap-junctional communication in planarian regeneration*. *Dev Biol*, 2005. **287**(2): p. 314-35.
70. Klar, A.J., *Support for the selective chromatid segregation hypothesis advanced for the mechanism of left-right body axis development in mice*. *Breast Dis*, 2008. **29**: p. 47-56.
71. Sauer, S. and A.J. Klar, *Left-right symmetry breaking in mice by left-right dynein may occur via a biased chromatid segregation mechanism, without directly involving the Nodal gene*. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 166.
72. Armakolas, A. and A.J. Klar, *Left-right dynein motor implicated in selective chromatid segregation in mouse cells*. *Science*, 2007. **315**(5808): p. 100-1.
73. Armakolas, A., M. Koutsilieris, and A.J. Klar, *Discovery of the mitotic selective chromatid segregation phenomenon and its implications for vertebrate development*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(1): p. 81-7.
74. Yu, C., M.J. Bonaduce, and A.J. Klar, *Defining the epigenetic mechanism of asymmetric cell division of *Schizosaccharomyces japonicus* yeast*. *Genetics*, 2013. **193**(1): p. 85-94.
75. Nakano, S., B. Stillman, and H.R. Horvitz, *Replication-coupled chromatin assembly generates a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans**. *Cell*, 2011. **147**(7): p. 1525-36.
76. Kawakami, R., et al., *Right isomerism of the brain in *inversus viscerum* mutant mice*. *PLoS One*, 2008. **3**(4): p. e1945.
77. Montcouquiol, M., *[Planar polarity in mammals: similarity and divergence with *Drosophila Melanogaster*]*. *J Soc Biol*, 2007. **201**(1): p. 61-7.
78. Zallen, J.A., *Planar polarity and tissue morphogenesis*. *Cell*, 2007. **129**(6): p. 1051-63.
79. Gray, R.S., I. Roszko, and L. Solnica-Krezel, *Planar cell polarity: coordinating morphogenetic cell behaviors with embryonic polarity*. *Dev Cell*, 2011. **21**(1): p. 120-33.
80. Zhang, Y. and M. Levin, *Left-right asymmetry in the chick embryo requires core planar cell polarity protein *Vangl2**. *Genesis*, 2009. **47**(11): p. 719-28.
81. Vandenberg, L.N. and M. Levin, *Polarity proteins are required for left-right axis orientation and twin-twin instruction*. *Genesis*, 2012. **50**(3): p. 219-34.
82. Vladar, E.K., et al., *Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia*. *Curr Biol*, 2012. **22**(23): p. 2203-12.
83. Molina, M.D., et al., *Nodal: master and commander of the dorsal-ventral and left-right axes in the sea urchin embryo*. *Curr Opin Genet Dev*, 2013. **23**(4): p. 445-53.
84. Duboc, V., et al., *Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side*. *Dev Cell*, 2005. **9**(1): p. 147-58.
85. Bessodes, N., et al., *Reciprocal signaling between the ectoderm and a mesendodermal left-right organizer directs left-right determination in the sea urchin embryo*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(12): p. e1003121.

86. Warner, J.F., D.C. Lyons, and D.R. McClay, *Left-right asymmetry in the sea urchin embryo: BMP and the asymmetrical origins of the adult*. PLoS Biol, 2012. **10**(10): p. e1001404.
87. Hibino, T., et al., *Ion flow regulates left-right asymmetry in sea urchin development*. Dev Genes Evol, 2006. **216**(5): p. 265-76.
88. Luo, Y.J. and Y.H. Su, *Opposing nodal and BMP signals regulate left-right asymmetry in the sea urchin larva*. PLoS Biol, 2012. **10**(10): p. e1001402.
89. Pehrson, J.R. and L.H. Cohen, *The fate of the small micromeres in sea urchin development*. Dev Biol, 1986. **113**(2): p. 522-6.
90. Yajima, M. and G.M. Wessel, *Autonomy in specification of primordial germ cells and their passive translocation in the sea urchin*. Development, 2012. **139**(20): p. 3786-94.
91. Deppe, U., et al., *Cell lineages of the embryo of the nematode Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(1): p. 376-80.
92. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
93. Pohl, C., *Left-right patterning in the C. elegans embryo: Unique mechanisms and common principles*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(1): p. 34-40.
94. Wood, W.B., D. Bergmann, and A. Florance, *Maternal effect of low temperature on handedness determination in C. elegans embryos*. Dev Genet, 1996. **19**(3): p. 222-30.
95. Goldstein, B. and I.G. Macara, *The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization*. Dev Cell, 2007. **13**(5): p. 609-22.
96. Willard, F.S., R.J. Kimple, and D.P. Siderovski, *Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 925-51.
97. Bergmann, D.C., et al., *Embryonic handedness choice in C. elegans involves the Galpha protein GPA-16*. Development, 2003. **130**(23): p. 5731-40.
98. Afshar, K., et al., *RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of C. elegans embryos*. Cell, 2004. **119**(2): p. 219-30.
99. Afshar, K., et al., *Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during C. elegans asymmetric cell division*. Development, 2005. **132**(20): p. 4449-59.
100. Johnston, C.A., et al., *Structural determinants underlying the temperature-sensitive nature of a Galpha mutant in asymmetric cell division of Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21550-8.
101. Kozlowski, C., M. Srayko, and F. Nedelec, *Cortical microtubule contacts position the spindle in C. elegans embryos*. Cell, 2007. **129**(3): p. 499-510.
102. Minc, N., et al., *Establishing new sites of polarization by microtubules*. Curr Biol, 2009. **19**(2): p. 83-94.
103. Pohl, C. and Z. Bao, *Chiral forces organize left-right patterning in C. elegans by uncoupling midline and anteroposterior axis*. Dev Cell, 2010. **19**(3): p. 402-12.
104. Poole, R.J. and O. Hobert, *Early embryonic programming of neuronal left/right asymmetry in C. elegans*. Curr Biol, 2006. **16**(23): p. 2279-92.
105. Langenhan, T., et al., *Latrophilin signaling links anterior-posterior tissue polarity and oriented cell divisions in the C. elegans embryo*. Dev Cell, 2009. **17**(4): p. 494-504.
106. Grande, C., *Left-right asymmetries in Spiralia*. Integr Comp Biol, 2010. **50**(5): p. 744-55.
107. Sturtevant, A.H., *Inheritance of Direction of Coiling in Limnaea*. Science, 1923. **58**(1501): p. 269-70.
108. Shibazaki, Y., M. Shimizu, and R. Kuroda, *Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo*. Curr Biol, 2004. **14**(16): p. 1462-7.

109. Kuroda, R., et al., *Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails*. *Nature*, 2009. **462**(7274): p. 790-4.
110. Grande, C. and N.H. Patel, *Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails*. *Nature*, 2009. **457**(7232): p. 1007-11.
111. Hayashi, M., et al., *Left-right asymmetry in the alimentary canal of the Drosophila embryo*. *Dev Growth Differ*, 2005. **47**(7): p. 457-60.
112. Coutelis, J.B., et al., *Left-right asymmetry in Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. **19**(3): p. 252-62.
113. Hayashi, T. and R. Murakami, *Left-right asymmetry in Drosophila melanogaster gut development*. *Dev Growth Differ*, 2001. **43**(3): p. 239-46.
114. Hozumi, S., et al., *An unconventional myosin in Drosophila reverses the default handedness in visceral organs*. *Nature*, 2006. **440**(7085): p. 798-802.
115. Takashima, S., et al., *The behaviour of Drosophila adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling*. *Nature*, 2008. **454**(7204): p. 651-5.
116. Pitsouli, C. and N. Perrimon, *Developmental biology: Our fly cousins' gut*. *Nature*, 2008. **454**(7204): p. 592-3.
117. Keisman, E.L. and B.S. Baker, *The Drosophila sex determination hierarchy modulates wingless and decapentaplegic signaling to deploy dachshund sex-specifically in the genital imaginal disc*. *Development*, 2001. **128**(9): p. 1643-56.
118. Pascual, A., et al., *Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory*. *Nature*, 2004. **427**(6975): p. 605-6.
119. Chintapalli, V.R., et al., *Functional correlates of positional and gender-specific renal asymmetry in Drosophila*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e32577.
120. Glise, B., H. Bourbon, and S. Noselli, *hemipterous encodes a novel Drosophila MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement*. *Cell*, 1995. **83**(3): p. 451-61.
121. Holland, P.M., et al., *MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 24994-8.
122. Macias, A., et al., *PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the Drosophila male terminalia*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(10): p. 1087-94.
123. Abbott, M.K. and J.A. Lengyel, *Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the Drosophila locus head involution defective*. *Genetics*, 1991. **129**(3): p. 783-9.
124. Adam, G., N. Perrimon, and S. Noselli, *The retinoic-like juvenile hormone controls the looping of left-right asymmetric organs in Drosophila*. *Development*, 2003. **130**(11): p. 2397-406.
125. Kuroda, J., et al., *Canonical Wnt signaling in the visceral muscle is required for left-right asymmetric development of the Drosophila midgut*. *Mech Dev*, 2012. **128**(11-12): p. 625-39.
126. Bajoghli, B., et al., *The roles of Groucho/Tle in left-right asymmetry and Kupffer's vesicle organogenesis*. *Dev Biol*, 2007. **303**(1): p. 347-61.
127. Lin, X. and X. Xu, *Distinct functions of Wnt/beta-catenin signaling in KV development and cardiac asymmetry*. *Development*, 2009. **136**(2): p. 207-17.
128. Maeda, R., et al., *Roles of single-minded in the left-right asymmetric development of the Drosophila embryonic gut*. *Mech Dev*, 2007. **124**(3): p. 204-17.
129. Nakamura, M., et al., *Reduced cell number in the hindgut epithelium disrupts hindgut left-right asymmetry in a mutant of pebble, encoding a RhoGEF, in Drosophila embryos*. *Mech Dev*, 2013. **130**(2-3): p. 169-80.
130. Okumura, T., et al., *Left-right asymmetric morphogenesis of the anterior midgut depends on the activation of a non-muscle myosin II in Drosophila*. *Dev Biol*, 2010. **344**(2): p. 693-706.

131. Fraichard, S., et al., *Tenectin is a novel alphaPS2betaPS integrin ligand required for wing morphogenesis and male genital looping in Drosophila*. *Dev Biol*, 2010. **340**(2): p. 504-17.
132. Lee, G., et al., *UVRAG is required for organ rotation by regulating Notch endocytosis in Drosophila*. *Dev Biol*, 2011. **356**(2): p. 588-97.
133. Eley, L., et al., *A perspective on inversin*. *Cell Biol Int*, 2004. **28**(2): p. 119-24.
134. Suzanne, M., et al., *Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping*. *Curr Biol*, 2010. **20**(19): p. 1773-8.
135. Takashima, S., et al., *Migration of Drosophila intestinal stem cells across organ boundaries*. *Development*, 2013. **140**(9): p. 1903-11.
136. Hozumi, S., et al., *Head region of unconventional myosin I family members is responsible for the organ-specificity of their roles in left-right polarity in Drosophila*. *Dev Dyn*, 2008. **237**(12): p. 3528-37.
137. Coutelis, J.B., et al., *Drosophila left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene abdominal-B*. *Dev Cell*, 2013. **24**(1): p. 89-97.
138. Petzoldt, A.G., et al., *DE-Cadherin regulates unconventional Myosin ID and Myosin IC in Drosophila left-right asymmetry establishment*. *Development*, 2012. **139**(10): p. 1874-84.
139. Taniguchi, K., et al., *Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis*. *Science*, 2011. **333**(6040): p. 339-41.
140. Roussigne, M., P. Blader, and S.W. Wilson, *Breaking symmetry: the zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain*. *Dev Neurobiol*, 2012. **72**(3): p. 269-81.
141. Sun, T. and C.A. Walsh, *Molecular approaches to brain asymmetry and handedness*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(8): p. 655-62.
142. Kennedy, D.N., et al., *Structural and functional brain asymmetries in human situs inversus totalis*. *Neurology*, 1999. **53**(6): p. 1260-5.
143. Tubbs, R.S., et al., *Intracranial anatomic asymmetry in situs inversus totalis*. *Anat Embryol (Berl)*, 2003. **206**(3): p. 199-202.
144. Halpern, M.E., et al., *Lateralization of the vertebrate brain: taking the side of model systems*. *J Neurosci*, 2005. **25**(45): p. 10351-7.
145. Barth, K.A., et al., *fsi zebrafish show concordant reversal of laterality of viscera, neuroanatomy, and a subset of behavioral responses*. *Curr Biol*, 2005. **15**(9): p. 844-50.
146. Scholey, J.M., *Kinesin-2: A Family of Heterotrimeric and Homodimeric Motors with Diverse Intracellular Transport Functions*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013.
147. Hoeng, J.C., et al., *High-resolution crystal structure and in vivo function of a kinesin-2 homologue in Giardia intestinalis*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(7): p. 3124-37.
148. Rashid, D.J., K.P. Wedaman, and J.M. Scholey, *Heterodimerization of the two motor subunits of the heterotrimeric kinesin, KRP85/95*. *J Mol Biol*, 1995. **252**(2): p. 157-62.
149. Doodhi, H., et al., *KAP, the accessory subunit of kinesin-2, binds the predicted coiled-coil stalk of the motor subunits*. *Biochemistry*, 2009. **48**(10): p. 2248-60.
150. Doodhi, H., et al., *Biochemical and molecular dynamic simulation analysis of a weak coiled coil association between kinesin-II stalks*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45981.
151. Pflanz, R., et al., *Follicle separation during Drosophila oogenesis requires the activity of the kinesin II-associated polypeptide Kap in germline cells*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(5): p. 510-4.
152. Jana, S.C., M. Girotra, and K. Ray, *Heterotrimeric kinesin-II is necessary and sufficient to promote different stepwise assembly of morphologically distinct bipartite cilia in Drosophila antenna*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(6): p. 769-81.
153. Vukajlovic, M., et al., *How kinesin-2 forms a stalk*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(22): p. 4279-87.

154. Brunnbauer, M., et al., *Regulation of a heterodimeric kinesin-2 through an unprocessive motor domain that is turned processive by its partner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(23): p. 10460-5.
155. Wedaman, K.P., et al., *Sequence and submolecular localization of the 115-kD accessory subunit of the heterotrimeric kinesin-II (KRP85/95) complex*. J Cell Biol, 1996. **132**(3): p. 371-80.
156. Yamazaki, H., et al., *Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8443-8.
157. Wickstead, B., K. Gull, and T.A. Richards, *Patterns of kinesin evolution reveal a complex ancestral eukaryote with a multifunctional cytoskeleton*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 110.
158. Wickstead, B. and K. Gull, *A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(4): p. 1734-43.
159. Dagenbach, E.M. and S.A. Endow, *A new kinesin tree*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 1): p. 3-7.
160. Rank, K.C. and I. Rayment, *Functional asymmetry in kinesin and dynein dimers*. Biol Cell, 2013. **105**(1): p. 1-13.
161. Pan, X., S. Acar, and J.M. Scholey, *Torque generation by one of the motor subunits of heterotrimeric kinesin-2*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **401**(1): p. 53-7.
162. Brunnbauer, M., et al., *Torque generation of kinesin motors is governed by the stability of the neck domain*. Mol Cell, 2012. **46**(2): p. 147-58.
163. Schroeder, H.W., 3rd, et al., *Force-dependent detachment of kinesin-2 biases track switching at cytoskeletal filament intersections*. Biophys J, 2012. **103**(1): p. 48-58.
164. Hao, L., et al., *Intraflagellar transport delivers tubulin isotypes to sensory cilium middle and distal segments*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(7): p. 790-8.
165. Wang, Q., J. Pan, and W.J. Snell, *Intraflagellar transport particles participate directly in cilium-generated signaling in Chlamydomonas*. Cell, 2006. **125**(3): p. 549-62.
166. Cole, D.G., et al., *Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in Caenorhabditis elegans sensory neurons*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 993-1008.
167. Snow, J.J., et al., *Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on C. elegans neurons*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1109-13.
168. Marszalek, J.R. and L.S. Goldstein, *Understanding the functions of kinesin-II*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1496**(1): p. 142-50.
169. Kodani, A., et al., *Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages*. EMBO J, 2013. **32**(4): p. 597-607.
170. Fan, S., et al., *Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions*. Curr Biol, 2004. **14**(16): p. 1451-61.
171. Sfakianos, J., et al., *Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1133-40.
172. Mukhopadhyay, B., S.C. Nam, and K.W. Choi, *Kinesin II is required for cell survival and adherens junction positioning in Drosophila photoreceptors*. Genesis, 2010. **48**(9): p. 522-30.
173. Insinna, C. and J.C. Besharse, *Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors*. Dev Dyn, 2008. **237**(8): p. 1982-92.
174. Trivedi, D., et al., *Live-cell imaging evidence for the ciliary transport of rod photoreceptor opsin by heterotrimeric kinesin-2*. J Neurosci, 2012. **32**(31): p. 10587-93.
175. Avasthi, P., et al., *Trafficking of membrane proteins to cone but not rod outer segments is dependent on heterotrimeric kinesin-II*. J Neurosci, 2009. **29**(45): p. 14287-98.

176. Lopes, V.S., et al., *Dysfunction of heterotrimeric kinesin-2 in rod photoreceptor cells and the role of opsin mislocalization in rapid cell death*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(23): p. 4076-88.
177. Jimeno, D., et al., *Analysis of kinesin-2 function in photoreceptor cells using synchronous Cre-loxP knockout of Kif3a with RHO-Cre*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(11): p. 5039-46.
178. Zhao, C., et al., *Kinesin-2 family in vertebrate ciliogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2388-93.
179. Jimeno, D., et al., *Kinesin-2 and photoreceptor cell death: requirement of motor subunits*. Exp Eye Res, 2006. **82**(2): p. 351-3.
180. Takeda, S., et al., *Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building*. J Cell Biol, 2000. **148**(6): p. 1255-65.
181. Ray, K., et al., *Kinesin-II is required for axonal transport of choline acetyltransferase in Drosophila*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 507-18.
182. Sadananda, A., et al., *Interaction with a kinesin-2 tail propels choline acetyltransferase flow towards synapse*. Traffic, 2012. **13**(7): p. 979-91.
183. Le Bot, N., et al., *Role of xklp3, a subunit of the Xenopus kinesin II heterotrimeric complex, in membrane transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus*. J Cell Biol, 1998. **143**(6): p. 1559-73.
184. Stauber, T., et al., *A role for kinesin-2 in COPI-dependent recycling between the ER and the Golgi complex*. Curr Biol, 2006. **16**(22): p. 2245-51.
185. Nekrasova, O.E., et al., *Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes*. J Cell Biol, 2011. **195**(7): p. 1185-203.
186. Brown, C.L., et al., *Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes*. Traffic, 2005. **6**(12): p. 1114-24.
187. Ginkel, L.M. and L. Wordeman, *Expression and partial characterization of kinesin-related proteins in differentiating and adult skeletal muscle*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4143-58.
188. Tuma, M.C., et al., *Heterotrimeric kinesin II is the microtubule motor protein responsible for pigment dispersion in Xenopus melanophores*. J Cell Biol, 1998. **143**(6): p. 1547-58.
189. Gaudin, R., et al., *Critical role for the kinesin KIF3A in the HIV life cycle in primary human macrophages*. J Cell Biol, 2012. **199**(3): p. 467-79.
190. Brown, J.M., et al., *Kinesin-II is preferentially targeted to assembling cilia and is required for ciliogenesis and normal cytokinesis in Tetrahymena*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(10): p. 3081-96.
191. Morris, R.L. and J.M. Scholey, *Heterotrimeric kinesin-II is required for the assembly of motile 9+2 ciliary axonemes on sea urchin embryos*. J Cell Biol, 1997. **138**(5): p. 1009-22.
192. Fan, J. and K.A. Beck, *A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 4): p. 619-29.
193. Keil, R., C. Kiessling, and M. Hatzfeld, *Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 8): p. 1174-83.
194. Betley, J.N., et al., *Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in Xenopus oocytes*. Curr Biol, 2004. **14**(3): p. 219-24.
195. Messitt, T.J., et al., *Multiple kinesin motors coordinate cytoplasmic RNA transport on a subpopulation of microtubules in Xenopus oocytes*. Dev Cell, 2008. **15**(3): p. 426-36.
196. Nishimura, T., et al., *Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(4): p. 328-34.
197. Shi, S.H., et al., *APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity*. Curr Biol, 2004. **14**(22): p. 2025-32.
198. Mattie, F.J., et al., *Directed microtubule growth, +TIPs, and kinesin-2 are required for uniform microtubule polarity in dendrites*. Curr Biol, 2010. **20**(24): p. 2169-77.

199. Sipe, C.W. and X. Lu, *Kif3a regulates planar polarization of auditory hair cells through both ciliary and non-ciliary mechanisms*. *Development*, 2011. **138**(16): p. 3441-9.
200. Jimbo, T., et al., *Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(4): p. 323-7.
201. Murawala, P., et al., *Nup358 interacts with APC and plays a role in cell polarization*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 17): p. 3113-22.
202. Boehlke, C., et al., *Kif3a guides microtubular dynamics, migration and lumen formation of MDCK cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e62165.
203. Teng, J., et al., *The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(5): p. 474-82.
204. Kolpakova-Hart, E., et al., *Kinesin-2 controls development and patterning of the vertebrate skeleton by Hedgehog- and Gli3-dependent mechanisms*. *Dev Biol*, 2007. **309**(2): p. 273-84.
205. Corbit, K.C., et al., *Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(1): p. 70-6.
206. Shimizu, K., et al., *SMAP, an Smg GDS-associating protein having arm repeats and phosphorylated by Src tyrosine kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(43): p. 27013-7.
207. Tanuma, N., et al., *Protein phosphatase Dusp26 associates with KIF3 motor and promotes N-cadherin-mediated cell-cell adhesion*. *Oncogene*, 2009. **28**(5): p. 752-61.
208. Deacon, S.W., et al., *Dynactin is required for bidirectional organelle transport*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(3): p. 297-301.
209. Williams, D.S., *Transport to the photoreceptor outer segment by myosin VIIa and kinesin II*. *Vision Res*, 2002. **42**(4): p. 455-62.
210. Levi, V., et al., *Organelle transport along microtubules in Xenopus melanophores: evidence for cooperation between multiple motors*. *Biophys J*, 2006. **90**(1): p. 318-27.
211. Marshall, W.F., *The cell biological basis of ciliary disease*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(1): p. 17-21.
212. Barakat, M.T., E.W. Humke, and M.P. Scott, *Kif3a is necessary for initiation and maintenance of medulloblastoma*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(6): p. 1382-92.
213. Lukong, K.E. and S. Richard, *Breast tumor kinase BRK requires kinesin-2 subunit KAP3A in modulation of cell migration*. *Cell Signal*, 2008. **20**(2): p. 432-42.
214. Tarabeux, J., et al., *De novo truncating mutation in Kinesin 17 associated with schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 2010. **68**(7): p. 649-56.
215. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. *Development*, 1993. **118**(2): p. 401-15.
216. Elliott, D.A. and A.H. Brand, *The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes*. *Methods Mol Biol*, 2008. **420**: p. 79-95.
217. McGuire, S.E., et al., *Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila*. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1765-8.
218. Ma, Y., et al., *Prevalence of off-target effects in Drosophila RNA interference screens*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 359-63.
219. Dietzl, G., et al., *A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila*. *Nature*, 2007. **448**(7150): p. 151-6.
220. Ma, J. and M. Ptashne, *A new class of yeast transcriptional activators*. *Cell*, 1987. **51**(1): p. 113-9.
221. Wang, W. and J.H. Yoder, *Drosophila pupal abdomen immunohistochemistry*. *J Vis Exp*, 2011(56).

222. Viktorinova, I. and C. Dahmann, *Microtubule polarity predicts direction of egg chamber rotation in Drosophila*. *Curr Biol*, 2013. **23**(15): p. 1472-7.
223. Snee, M.J. and P.M. Macdonald, *Dynamic organization and plasticity of sponge bodies*. *Dev Dyn*, 2009. **238**(4): p. 918-30.
224. Blagden, S.P., et al., *Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development*. *Dev Biol*, 2009. **334**(1): p. 186-97.
225. Herold, N., et al., *Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of Drosophila melanogaster and human spliceosomal complexes*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(1): p. 281-301.
226. Worringer, K.A., F. Chu, and B. Panning, *The zinc finger protein Zn72D and DEAD box helicase Belle interact and control maleless mRNA and protein levels*. *BMC Mol Biol*, 2009. **10**: p. 33.
227. Sinsimer, K.S., et al., *A late phase of germ plasm accumulation during Drosophila oogenesis requires lost and rumpelstiltskin*. *Development*, 2011. **138**(16): p. 3431-40.
228. Dayan, A., et al., *Cloning and characterization of the human 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase-encoding cDNA*. *Gene*, 1995. **165**(2): p. 307-11.
229. Anguera, M.C., et al., *Methenyltetrahydrofolate synthetase regulates folate turnover and accumulation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 29856-62.
230. Zhu, H., et al., *Cardiovascular abnormalities in Fcrl1 knockout mice and folate rescue*. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2007. **79**(4): p. 257-68.
231. Pickell, L., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate increase embryonic delay and placental abnormalities in mice*. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2009. **85**(6): p. 531-41.
232. Sun, Y.H., et al., *White as a reporter gene to detect transcriptional silencers specifying position-specific gene expression during Drosophila melanogaster eye development*. *Genetics*, 1995. **141**(3): p. 1075-86.
233. Roll-Mecak, A. and R.D. Vale, *Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin*. *Nature*, 2008. **451**(7176): p. 363-7.
234. Sarpal, R., et al., *Drosophila KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails*. *Curr Biol*, 2003. **13**(19): p. 1687-96.
235. Kann, M.L., et al., *Glutamylated tubulin: diversity of expression and distribution of isoforms*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2003. **55**(1): p. 14-25.
236. Gogendeau, D. and R. Basto, *Centrioles in flies: the exception to the rule?* *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(2): p. 163-73.
237. Ma, L. and A.P. Jarman, *Dilatory is a Drosophila protein related to AZI1 (CEP131) that is located at the ciliary base and required for cilium formation*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 15): p. 2622-30.
238. Laurencon, A., et al., *Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in Drosophila species*. *Genome Biol*, 2007. **8**(9): p. R195.
239. Bonnafé, E., et al., *The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(10): p. 4417-27.
240. Pinal, N., et al., *Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P3 accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells*. *Curr Biol*, 2006. **16**(2): p. 140-9.
241. Tepass, U., *The apical polarity protein network in Drosophila epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012. **28**: p. 655-85.
242. Hutterer, A., et al., *Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during Drosophila embryogenesis*. *Dev Cell*, 2004. **6**(6): p. 845-54.

243. Letizia, A., et al., *Regulated Crb accumulation controls apical constriction and invagination in Drosophila tracheal cells*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 2): p. 240-51.
244. Chartier, F.J., E.J. Hardy, and P. Laprise, *Crumbs controls epithelial integrity by inhibiting Rac1 and PI3K*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 20): p. 3393-8.
245. Roch, F., et al., *Differential roles of PtdIns(4,5)P2 and phosphorylation in moesin activation during Drosophila development*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 12): p. 2058-67.
246. Laprise, P., et al., *The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size*. Dev Cell, 2006. **11**(3): p. 363-74.
247. Xu, T. and G.M. Rubin, *Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues*. Development, 1993. **117**(4): p. 1223-37.
248. Munemitsu, S., et al., *Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 3046-50.
249. Stamos, J.L. and W.I. Weis, *The beta-catenin destruction complex*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(1): p. a007898.
250. Rubinfeld, B., et al., *Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1023-6.
251. Hayashi, S., et al., *A Drosophila homolog of the tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli down-regulates beta-catenin but its zygotic expression is not essential for the regulation of Armadillo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 242-7.
252. Harris, E.S. and W.J. Nelson, *Adenomatous polyposis coli regulates endothelial cell migration independent of roles in beta-catenin signaling and cell-cell adhesion*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(15): p. 2611-23.
253. Wienholds, E. and R.H. Plasterk, *MicroRNA function in animal development*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5911-22.
254. Zhao, Y. and D. Srivastava, *A developmental view of microRNA function*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(4): p. 189-97.
255. Johnston, R.J. and O. Hobert, *A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 845-9.
256. Chang, S., et al., *MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode*. Nature, 2004. **430**(7001): p. 785-9.
257. Li, N., et al., *Regulation of endoderm formation and left-right asymmetry by miR-92 during early zebrafish development*. Development, 2011. **138**(9): p. 1817-26.
258. Lundelius, G.F.a.J.W., *The Developmental Genetics of Dextrality and Sinistrality in the Gastropod Lymnaea peregra* Roux's Archives of Developmental Biology 1982. **191**: p. 69-83.
259. Degner, E., *Der Ergang der Inversion bei Laciniaria biplicata MTG (Gastr pulm)* Mittl Hamburg Zool Mus 1952. **51:3-61**.
260. Murray J, C.B., *The inheritance of polymorphic shell characters in Partula (Gastropoda)* Genetics, 1966. **54**: p. 1261-1277.
261. Wan, L.Q., et al., *Micropatterned mammalian cells exhibit phenotype-specific left-right asymmetry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12295-300.
262. Petzoldt, A., *DE-cadherin regulates unconventional myosin ID through myosin IC in Drosophila melanogaster*. 2009, Université de Nice-Sophia Antipolis: Nice.
263. Chen, C.L., et al., *Myosin I links PIP3 signaling to remodeling of the actin cytoskeleton in chemotaxis*. Sci Signal, 2012. **5**(209): p. ra10.

264. Chen, C.L. and M. Iijima, *Myosin I: A new pip(3) effector in chemotaxis and phagocytosis*. *Commun Integr Biol*, 2012. **5**(3): p. 294-6.
265. Nambiar, R., R.E. McConnell, and M.J. Tyska, *Control of cell membrane tension by myosin-I*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(29): p. 11972-7.
266. Pyrpassopoulos, S., et al., *Membrane-bound myo1c powers asymmetric motility of actin filaments*. *Curr Biol*, 2012. **22**(18): p. 1688-92.
267. Abe, T., S. Thitamadee, and T. Hashimoto, *Microtubule defects and cell morphogenesis in the lefty1lefty2 tubulin mutant of Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2004. **45**(2): p. 211-20.
268. Thitamadee, S., K. Tuchiara, and T. Hashimoto, *Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis*. *Nature*, 2002. **417**(6885): p. 193-6.
269. Nakamura, M. and T. Hashimoto, *A mutation in the Arabidopsis gamma-tubulin-containing complex causes helical growth and abnormal microtubule branching*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 13): p. 2208-17.
270. Lobikin, M., et al., *Early, nonciliary role for microtubule proteins in left-right patterning is conserved across kingdoms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. 12586-91.
271. Jones, C., et al., *Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation*. *Nat Genet*, 2008. **40**(1): p. 69-77.
272. Honnappa, S., et al., *An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 366-76.
273. Shimada, Y., et al., *Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in Drosophila wing epithelium*. *Dev Cell*, 2006. **10**(2): p. 209-22.
274. Morrison, E.E., et al., *EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle*. *Oncogene*, 1998. **17**(26): p. 3471-7.
275. Satir, P., D.R. Mitchell, and G. Jekely, *How did the cilium evolve?* *Curr Top Dev Biol*, 2008. **85**: p. 63-82.
276. Jekely, G. and D. Arendt, *Evolution of intraflagellar transport from coated vesicles and autogenous origin of the eukaryotic cilium*. *Bioessays*, 2006. **28**(2): p. 191-8.
277. Vandenberg, L.N. and M. Levin, *Consistent left-right asymmetry cannot be established by late organizers in Xenopus unless the late organizer is a conjoined twin*. *Development*, 2010. **137**(7): p. 1095-105.
278. Scharf, S.R. and J.C. Gerhart, *Axis determination in eggs of Xenopus laevis: a critical period before first cleavage, identified by the common effects of cold, pressure and ultraviolet irradiation*. *Dev Biol*, 1983. **99**(1): p. 75-87.
279. Vincent, J.P., S.R. Scharf, and J.C. Gerhart, *Subcortical rotation in Xenopus eggs: a preliminary study of its mechanochemical basis*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1987. **8**(2): p. 143-54.
280. Scharf, S.R. and J.C. Gerhart, *Determination of the dorsal-ventral axis in eggs of Xenopus laevis: complete rescue of uv-impaired eggs by oblique orientation before first cleavage*. *Dev Biol*, 1980. **79**(1): p. 181-98.
281. Engleka, M.J. and D.S. Kessler, *Siamesis cooperates with TGFbeta signals to induce the complete function of the Spemann-Mangold organizer*. *Int J Dev Biol*, 2001. **45**(1): p. 241-50.
282. Fan, M.J. and S.Y. Sokol, *A role for Siamesis in Spemann organizer formation*. *Development*, 1997. **124**(13): p. 2581-9.
283. Kao, K.R. and R.P. Elinson, *Dorsalization of mesoderm induction by lithium*. *Dev Biol*, 1989. **132**(1): p. 81-90.
284. Kessler, D.S., *Siamesis is required for formation of Spemann's organizer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13017-22.

Annexes 1

Crible secondaire sur le troisième chromosome

| stock | déficience | Phenotype de rotation | | | | | n |
|-------|----------------|-----------------------|----------|-----|----------|----|-----|
| | | SF | Total SP | NR | Total DP | DF | |
| W118 | | 19% | 77% | 3% | 0% | 0% | 124 |
| 25119 | Df(3L)BSC557 | 13% | 83% | 4% | 0% | 0% | 24 |
| 8061 | Df(3L)ED210 | 0% | 75% | 25% | 0% | 0% | 4 |
| 8062 | Df(3L)ED4342 | 58% | 42% | 0% | 0% | 0% | 43 |
| 8060 | Df(3L)ED4341 | 0% | 89% | 11% | 0% | 0% | 19 |
| 7580 | Df(3L)Exel6101 | 0% | 61% | 39% | 0% | 0% | 23 |
| 7925 | Df(3L)Exel9028 | 6% | 41% | 53% | 0% | 0% | 17 |
| 7923 | Df(3L)Exel9058 | 18% | 82% | 0% | 0% | 0% | 17 |
| 7926 | Df(3L)Exel7208 | 0% | 100% | 0% | 0% | 0% | 3 |
| 7581 | Df(3L)Exel6102 | 44% | 52% | 4% | 0% | 0% | 27 |
| 24940 | Df(3L)BSC436 | 50% | 50% | 0% | 0% | 0% | 12 |
| 24395 | Df(3L)BSC371 | 4% | 96% | 0% | 0% | 0% | 24 |
| 24396 | Df(3L)BSC372 | 11% | 84% | 5% | 0% | 0% | 19 |
| 7582 | Df(3L)Exel6103 | 27% | 55% | 18% | 0% | 0% | 11 |
| 7581 | Df(3L)Exel6102 | 40% | 60% | 0% | 0% | 0% | 20 |
| 7583 | Df(3L)Exel6104 | 45% | 55% | 0% | 0% | 0% | 29 |
| 7584 | Df(3L)Exel6105 | 44% | 56% | 0% | 0% | 0% | 25 |
| 24411 | Df(3L)BSC387 | 0% | 90% | 10% | 0% | 0% | 10 |
| 7585 | Df(3L)Exel6106 | 59% | 41% | 0% | 0% | 0% | 27 |
| 9355 | Df(3L)ED4457 | 0% | 46% | 54% | 0% | 0% | 26 |
| 24943 | Df(3L)BSC439 | 11% | 89% | 0% | 0% | 0% | 9 |
| 29023 | Df(3L)BSC838 | 9% | 87% | 4% | 0% | 0% | 23 |
| 24401 | Df(3L)BSC377 | 26% | 74% | 0% | 0% | 0% | 23 |
| 24402 | Df(3L)BSC378 | 80% | 20% | 0% | 0% | 0% | 10 |
| 26526 | Df(3L)BSC674 | 31% | 67% | 2% | 0% | 0% | 64 |
| 24961 | Df(3L)BSC457 | 71% | 29% | 0% | 0% | 0% | 24 |
| 8068 | Df(3L)ED4470 | 0% | 83% | 17% | 0% | 0% | 12 |
| 8070 | Df(3L)ED4483 | 25% | 69% | 6% | 0% | 0% | 16 |
| 24404 | Df(3L)BSC380 | 33% | 63% | 4% | 0% | 0% | 24 |
| 24917 | Df(3L)BSC413 | 39% | 58% | 3% | 0% | 0% | 33 |
| 24405 | Df(3L)BSC381 | 53% | 47% | 0% | 0% | 0% | 32 |
| 8072 | Df(3L)ED4486 | 19% | 78% | 3% | 0% | 0% | 37 |
| 25688 | Df(3L)BSC613 | 18% | 76% | 6% | 0% | 0% | 33 |
| 8071 | Df(3L)ED215 | 6% | 94% | 0% | 0% | 0% | 16 |
| 24405 | Df(3L)BSC381 | 50% | 50% | 0% | 0% | 0% | 8 |
| 7596 | Df(3L)Exel6117 | 13% | 63% | 25% | 0% | 0% | 24 |
| 8074 | Df(3L)ED217 | 6% | 70% | 24% | 0% | 0% | 33 |
| 8073 | Df(3L)ED4543 | 2% | 57% | 41% | 0% | 0% | 44 |
| 7602 | Df(3L)Exel6123 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0* |
| 7601 | Df(3L)Exel6122 | 24% | 55% | 21% | 0% | 0% | 42 |

| stock | déficiency | Phenotype de rotation | | | | | n |
|-------|-----------------|-----------------------|----------|-----|----------|----|-----|
| | | SF | Total SP | NR | Total DP | DF | |
| W118 | | 19% | 77% | 3% | 0% | 0% | 124 |
| 7600 | Df(3L)Exel6121 | 61% | 36% | 3% | 0% | 0% | 33 |
| 7599 | Df(3L)Exel6120 | 53% | 39% | 6% | 0% | 3% | 36 |
| 9074 | Df(3L)ED4534 | 19% | 74% | 6% | 0% | 0% | 31 |
| 9072 | Df(3L)ED4528 | 9% | 78% | 13% | 0% | 0% | 23 |
| 9071 | Df(3L)ED4515 | 8% | 46% | 42% | 0% | 4% | 26 |
| 9073 | Df(3L)ED4529 | 0% | 60% | 40% | 0% | 0% | 15 |
| 26835 | Df(3L)BSC737 | 51% | 47% | 2% | 0% | 0% | 43 |
| 25689 | Df(3L)BSC614 | 31% | 67% | 3% | 0% | 0% | 36 |
| 9214 | Df(3L)ED4536 | 0% | 67% | 33% | 0% | 0% | 30 |
| 27373 | Df(3L)BSC801 | 13% | 53% | 13% | 0% | 0% | 30 |
| 8097 | Df(3L)ED4502 | 45% | 55% | 0% | 0% | 0% | 31 |
| 9196 | Df(3R)ED5021 | 13% | 80% | 7% | 0% | 0% | 15 |
| 9226 | Df(3R)ED5100 | 65% | 35% | 0% | 0% | 0% | 17 |
| 9197 | Df(3R)ED5046 | 81% | 19% | 0% | 0% | 0% | 27 |
| 9224 | Df(3R)ED5071 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0* |
| 24925 | Df(3R)BSC421 | 47% | 50% | 3% | 0% | 0% | 30 |
| 9606 | Df(3R)BSC173 | 40% | 57% | 3% | 0% | 0% | 30 |
| 9538 | Df(3R)BSC146 | 63% | 37% | 0% | 0% | 0% | 27 |
| 24342 | Df(3R)BSC316 | 88% | 12% | 0% | 0% | 0% | 25 |
| 7620 | Df(3R)Exel6141 | 41% | 55% | 3% | 0% | 0% | 29 |
| 8091 | Df(3R)ED5092 | 87% | 13% | 0% | 0% | 0% | 23 |
| 8092 | Df(3R)ED5066 | 38% | 63% | 0% | 0% | 0% | 16 |
| 8093 | Df(3R)ED5095 | 33% | 67% | 0% | 0% | 0% | 15 |
| 9720 | Df(3R)BSC246 | 29% | 71% | 0% | 0% | 0% | 31 |
| 9607 | Df(3R)BSC174 | 31% | 69% | 0% | 0% | 0% | 13 |
| 7619 | Df(3R)Exel6140 | 50% | 50% | 0% | 0% | 0% | 26 |
| 9075 | Df(3R)ED5020 | 41% | 56% | 3% | 0% | 0% | 34 |
| 9198 | Df(3R)ED5142 | 37% | 63% | 0% | 0% | 0% | 19 |
| 7621 | Df(3R)Exel6142: | 66% | 34% | 0% | 0% | 0% | 38 |
| 7622 | Df(3R)Exel6143 | 46% | 38% | 4% | 0% | 4% | 24 |
| 8680 | Df(3R)ED5138 | 0% | 88% | 13% | 0% | 0% | 24 |
| 9608 | Df(3R)BSC175 | 51% | 29% | 2% | 0% | 6% | 51 |
| 8967 | Df(3R)ED5147 | 4% | 83% | 13% | 0% | 0% | 23 |
| 24334 | Df(3R)BSC176 | 73% | 27% | 0% | 0% | 0% | 30 |
| 9499 | Df(3R)BSC139 | 50% | 47% | 3% | 0% | 0% | 32 |
| 8965 | Df(3R)ED5156 | 8% | 77% | 15% | 0% | 0% | 26 |
| 9692 | Df(3R)BSC177 | 52% | 44% | 4% | 0% | 0% | 27 |
| 25696 | Df(3R)BSC621 | 44% | 56% | 0% | 0% | 0% | 27 |
| 9227 | Df(3R)ED5428 | 44% | 56% | 0% | 0% | 0% | 32 |

| stock | déficiency | Phenotype de rotation | | | | | n |
|-------|----------------|-----------------------|----------|-----|----------|----|-----|
| | | SF | Total SP | NR | Total DP | DF | |
| W118 | | 19% | 77% | 3% | 0% | 0% | 124 |
| 25054 | Df(3R)BSC526 | 17% | 77% | 7% | 0% | 0% | 30 |
| 24972 | Df(3R)BSC468 | 38% | 62% | 0% | 0% | 0% | 21 |
| 7632 | Df(3R)Exel6153 | 72% | 19% | 8% | 0% | 0% | 36 |
| 9080 | Df(3R)ED5454 | 5% | 91% | 5% | 0% | 0% | 22 |
| 7731 | Df(3R)Exel6264 | 93% | 7% | 0% | 0% | 0% | 30 |
| 8919 | Df(3R)ED5429 | 75% | 25% | 0% | 0% | 0% | 24 |
| 24980 | Df(3R)BSC476 | 53% | 37% | 10% | 0% | 0% | 30 |
| 7634 | Df(3R)Exel6155 | 68% | 32% | 0% | 0% | 0% | 22 |
| 7633 | Df(3R)Exel6154 | 31% | 67% | 3% | 0% | 0% | 39 |
| 25056 | Df(3R)BSC528 | 56% | 44% | 0% | 0% | 0% | 25 |
| 9078 | Df(3R)ED5438 | 21% | 67% | 13% | 0% | 0% | 24 |
| 25011 | Df(3R)BSC507 | 11% | 82% | 8% | 0% | 0% | 38 |
| 7664 | Df(3R)Exel6185 | 41% | 59% | 0% | 0% | 0% | 17 |
| 9479 | Df(3R)ED6027 | 4% | 89% | 7% | 0% | 0% | 28 |
| 25726 | Df(3R)BSC636 | 86% | 14% | 0% | 0% | 0% | 14 |
| 27380 | Df(3R)BSC809 | 38% | 57% | 5% | 0% | 0% | 21 |
| 7663 | Df(3R)Exel6184 | 56% | 44% | 0% | 0% | 0% | 34 |
| 27922 | Df(3R)BSC850 | 41% | 56% | 4% | 0% | 0% | 27 |
| 24979 | Df(3R)BSC475 | 57% | 40% | 3% | 0% | 0% | 30 |
| 27579 | Df(3R)BSC818 | 26% | 69% | 6% | 0% | 0% | 35 |
| 24139 | Df(3R)ED5938 | 7% | 80% | 13% | 0% | 0% | 15 |
| 25020 | Df(3R)BSC516 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0* |
| 25021 | Df(3R)BSC517 | 33% | 67% | 0% | 0% | 0% | 6 |
| 27379 | Df(3R)BSC808 | 69% | 31% | 0% | 0% | 0% | 26 |
| 8922 | Df(3R)ED5942 | 15% | 85% | 0% | 0% | 0% | 13 |
| 8964 | Df(3R)ED6025 | 41% | 59% | 0% | 0% | 0% | 17 |
| 24992 | Df(3R)BSC488 | 50% | 0% | 0% | 0% | 0% | 10 |
| 9501 | Df(3R)BSC141 | 13% | 88% | 0% | 0% | 0% | 8 |
| 9289 | Df(3R)BSC124 | 75% | 25% | 0% | 0% | 0% | 16 |
| 8962 | Df(3R)ED6076 | 55% | 45% | 0% | 0% | 0% | 29 |
| 7666 | Df(3R)Exel6187 | 25% | 75% | 0% | 0% | 0% | 8 |
| 26529 | Df(3R)BSC677 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0* |
| 26530 | Df(3R)BSC678 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0* |
| 27377 | Df(3R)BSC805 | 21% | 64% | 14% | 0% | 0% | 28 |
| 7667 | Df(3R)Exel6188 | 0% | 100% | 0% | 0% | 0% | 33 |
| 25051 | Df(3R)BSC523 | 0% | 80% | 20% | 0% | 0% | 5 |
| 9091 | Df(3R)ED6090 | 60% | 28% | 12% | 0% | 0% | 25 |
| 7668 | Df(3R)Exel6189 | 65% | 35% | 0% | 0% | 0% | 26 |

| Phenotype de rotation | | | | | | | n |
|-----------------------|----------------|-----|----------|-----|----------|----|-----|
| stock | déficience | SF | Total SP | NR | Total DP | DF | |
| W118 | | 19% | 77% | 3% | 0% | 0% | 124 |
| 25727 | Df(3R)BSC637 | 58% | 39% | 3% | 0% | 0% | 36 |
| 7670 | Df(3R)Exel6191 | 57% | 37% | 6% | 0% | 0% | 35 |
| 7740 | Df(3R)Exel6273 | 83% | 17% | 0% | 0% | 0% | 23 |
| 8684 | Df(3R)ED6096 | 0% | 9% | 91% | 0% | 0% | 34 |
| 9092 | Df(3R)ED6091 | 28% | 64% | 8% | 0% | 0% | 36 |
| 7671 | Df(3R)Exel6192 | 35% | 60% | 4% | 0% | 0% | 48 |
| 27376 | Df(3R)BSC804 | 80% | 20% | 0% | 0% | 0% | 20 |
| 26537 | Df(3R)BSC685 | 37% | 58% | 5% | 0% | 0% | 19 |
| 25694 | Df(3R)BSC619 | 0% | 67% | 33% | 0% | 0% | 15 |
| 27375 | Df(3R)BSC803 | 0% | 47% | 47% | 7% | 0% | 15 |
| 7672 | Df(3R)Exel6193 | 12% | 50% | 38% | 0% | 0% | 26 |
| 25693 | Df(3R)BSC618 | 17% | 47% | 37% | 0% | 0% | 30 |
| 7746 | Df(3R)Exel6280 | 48% | 52% | 0% | 0% | 0% | 27 |
| 7741 | Df(3R)Exel6274 | 25% | 67% | 8% | 0% | 0% | 12 |
| 7990 | Df(3R)Exel9012 | 17% | 83% | 0% | 0% | 0% | 29 |
| 28827 | Df(3R)ED10893 | 6% | 89% | 6% | 0% | 0% | 18 |
| 7677 | Df(3R)Exel6198 | 35% | 65% | 0% | 0% | 0% | 23 |
| 24343 | Df(3R)BSC317 | 22% | 72% | 6% | 0% | 0% | 18 |
| 7678 | Df(3R)Exel6199 | 71% | 29% | 0% | 0% | 0% | 14 |
| 7993 | Df(3R)Exel8178 | 36% | 64% | 0% | 0% | 0% | 14 |
| 7948 | Df(3R)Exel7357 | 45% | 55% | 0% | 0% | 0% | 33 |
| 9211 | Df(3R)ED6220 | 6% | 82% | 12% | 0% | 0% | 17 |
| 24996 | Df(3R)BSC492 | 22% | 78% | 0% | 0% | 0% | 9 |
| 2363 | Df(3R)crb87-5 | 32% | 64% | 5% | 0% | 0% | 22 |
| 25728 | Df(3R)BSC638 | 36% | 50% | 14% | 0% | 0% | 22 |
| 27346 | Df(3L)BSC774 | 0% | 34% | 66% | 0% | 0% | 29 |
| 25122 | Df(3L)BSC560 | 25% | 75% | 0% | 0% | 0% | 8 |
| 8077 | Df(3L)ED220 | 0% | 86% | 14% | 0% | 0% | 7 |
| 8078 | Df(3L)ED4606 | 0% | 100% | 0% | 0% | 0% | 6 |
| 27369 | Df(3L)BSC797 | 53% | 47% | 0% | 0% | 0% | 17 |
| 24953 | Df(3L)BSC449 | 65% | 29% | 6% | 0% | 0% | 17 |
| 26831 | Df(3L)BSC733 | 48% | 52% | 0% | 0% | 0% | 21 |
| 24143 | Df(3R)ED6361 | 77% | 15% | 8% | 0% | 0% | 26 |
| 26539 | Df(3R)BSC687 | 41% | 59% | 0% | 0% | 0% | 27 |
| 24144 | Df(3R)ED6362 | 56% | 39% | 6% | 0% | 0% | 18 |
| 24516 | Df(3R)ED50003 | 27% | 73% | 0% | 0% | 0% | 11 |

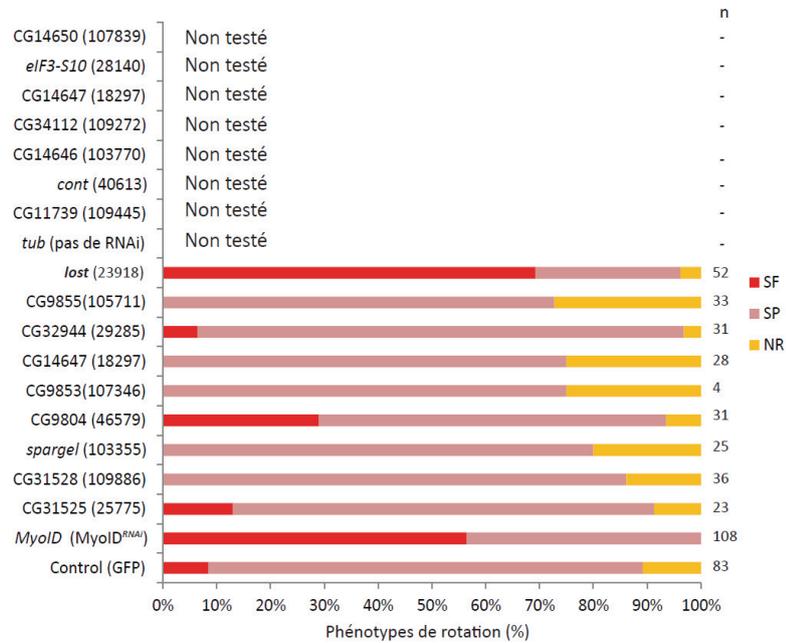
Les références des stocks qui correspondent aux grandes déficiences utilisées pour le crible primaire sont indiquées en rouge.

* signifie que le croisement est léthal

Crible tertiaire RNAi

Région génomique 82A5-82B2

Ptc::Gal4,myoID^{RNAi};UAS::myoID^{RNAi} X



Les RNAi sont indiqués comme suit : nom ou identification du gène ciblé suivi de l'identifiant VDRC du RNAi.

Résumé de la thèse

Dans le règne animal, l'établissement correct de l'axe droite/gauche (D/G) est essentiel au développement, au positionnement et au bon fonctionnement des organes vitaux. Chez les vertébrés, les cils jouent un rôle important dans la phase tardive de la détermination D/G. En revanche, chez les invertébrés c'est le cytosquelette d'actine qui est requis pour l'établissement de l'axe D/G. En particulier, chez *Drosophila melanogaster*, l'orientation horaire (dextrale) des organes est déterminée par un gène unique codant la Myosine non conventionnelle de type ID (MyoID). Les mécanismes cellulaires impliqués dans la brisure de symétrie initiale et sa propagation à l'ensemble du tissu sont, chez la drosophile, encore mal connus. Afin d'identifier de nouveaux gènes interagissant avec *myoID*, nous avons entrepris un crible génétique modificateur en contexte très sensibilisé pour *myoID*. Grâce à ce crible, plusieurs gènes interagissant génétiquement avec *myoID* ont pu être isolés parmi lesquels *klp64D*. Celui-ci code l'une des sous-unités motrices du complexe moteur hétérotrimérique Kinésine-2. La Kinésine-2 est constituée de deux sous-unités motrices distinctes Klp64D et Klp68D et d'une sous-unité adaptatrice Kap3. Nous montrons que *klp68D* interagit génétiquement avec *myoID* lors de la mise en place de l'axe D/G. Ceci suggère donc un rôle de l'ensemble du complexe hétérotrimérique Kinésine-2 dans l'asymétrie D/G. Chez les vertébrés, la Kinésine-2 participe à l'assemblage des cils impliqués dans la détermination D/G lors de la gastrulation. Or, nos résultats démontrent que, chez la drosophile, les cils ne sont pas requis dans la détermination D/G. L'inactivation des gènes codant chaque sous-unité de la Kinésine-2 indique que ce complexe est requis dans la voie dextrale dépendant de MyoID. L'utilisation d'un système inductible thermosensible révèle que MyoID et la Kinésine-2 sont requis de manière synchrone lors de la détermination D/G. En outre, nous mettons en évidence le rôle important joué par la Kinésine-2 dans la rotation horaire du génitalia et l'enroulement dextral de l'intestin postérieur adulte (*hindgut*). Nous montrons également que la Kinésine-2 est requise dans l'organisateur D/G de l'*hindgut* adulte pour l'orientation biaisée des cellules qui n'expriment pas MyoID. Or, de manière intéressante nos résultats suggèrent que l'activité de la Kinésine-2 n'est pas requise dans le sous-ensemble de cellules qui exprime MyoID. De plus, le rôle joué par la Kinésine-2 dans l'asymétrie D/G semble indépendant de la polarité apico-basale et des jonctions adhérentes. Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère que la Kinésine-2 pourrait jouer un rôle non ciliaire dans la phase de propagation de l'information directionnelle induite par MyoID. Ces résultats nous permettent ainsi pour la première fois d'envisager le rôle d'un moteur microtubulaire dans la détermination D/G chez les invertébrés. Nos résultats suggèrent enfin un lien évolutif fort entre la drosophile et les vertébrés dans la morphogenèse D/G.