



**HAL**  
open science

# Rôle de la protéine APPL dans la croissance axonale des corps pédonculés chez *Drosophila melanogaster*

Claire Marquilly

► **To cite this version:**

Claire Marquilly. Rôle de la protéine APPL dans la croissance axonale des corps pédonculés chez *Drosophila melanogaster*. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT045 . tel-02297318

**HAL Id: tel-02297318**

**<https://theses.hal.science/tel-02297318>**

Submitted on 26 Sep 2019

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neuro-génétique

École doctorale CBS2

Unité de recherche IGH, UMR 9002

Rôle de la protéine APPL dans la croissance axonale  
des corps pédonculés chez *Drosophila melanogaster*

Présentée par Claire MARQUILLY

Le 25 septembre 2017

Sous la direction de Jean-Maurice DURA

Devant le jury composé de

Valérie CASTELLANI, DR1, Université Claude Bernard-Lyon1

Jean-Maurice DURA, DR1, IGH

Bassem HASSAN, DR, ICM

Florence MASCHAT, DR, MMDN

Marie-Laure PARMENTIER, DR2, IGF

Frédéric SAUDOU, DR, GIN

Rapporteur

Directeur de thèse

Rapporteur

Présidente du jury

Examineur

Examineur



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury qui ont accepté de donner de leur temps pour lire et juger ce manuscrit.

Si je devais résumer ces quatre dernières années de thèse, je crois que le terme éprouvant serait correct (surtout durant la partie rédaction), mais enrichissant serait bien plus juste, aussi bien sur le plan professionnel, que personnel.

C'est à mon directeur de thèse **Jean-Maurice Dura** que je dois la découverte de monde passionnant de la génétique de la drosophile. Merci de m'avoir acceptée dans ton équipe il y a maintenant presque 5 ans, en stage de Master 2. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir partagé tes connaissances et ta passion pour la neurogénétique avec moi et d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions.

Je tiens à remercier les gens exceptionnels qui forme mon équipe. **Ana**, merci d'avoir toujours été là, tu es la personne la plus gentille qu'il m'a été donné de rencontrer. Tu as toujours été un soutien sans faille pendant ces dernières années. Tu es celle qui a su me calmer durant mes moments de colère ou de déprime, et qui s'est réjouie avec moi dans mes moments d'euphorie. Je ne suis pas sûre de ce qui serai advenu de moi sans toi ici... **Camille**, merci de me montrer que ma folie n'est pas synonyme d'anormalité. N'oublions jamais que majorité ne fait pas normalité ! Il faut dire quand même qu'entre tes phrases à double sens, et ton caractère bien trempé (oui tu râles !), tu m'as bien faite rire durant cette dernière année. **Germain**, si on m'avait dit que j'aurai à partager mon bureau avec un olibrius comme toi, j'aurais peut-être réfléchi à deux fois avant de commencer ma thèse... Plus sérieusement, merci d'avoir été là, c'est toujours agréable et plaisant de venir travailler avec quelqu'un qui partage le même humour (certes particulier), et les mêmes références cinématographiques. Je me suis sentie moins seule et bizarre grâce à toi.

Cette équipe ne serait pas complète sans celle de **Martine Simonelig**, avec qui nous partageons le 2<sup>ème</sup> étage de l'institut, et que je remercie pour son soutien et ses idées sur le projet pendant les réunions d'équipe. Un grand merci à toi, **Stéphanie**. Qui aurait cru que je rencontrerai une amie telle que toi dans ce milieu de fou. Je te suis tellement reconnaissante d'avoir été là, de ton soutien et de ta confiance en moi. **Gwen**, merci pour toutes ces conversations, ces tentatives de refaire le monde, ces fou-rires, et surtout pour m'avoir montré qu'on pouvait concilier le fait d'être une bonne maman et une bonne scientifique. **Camille**, merci de ton soutien et de ta motivation durant ces derniers mois, merci pour les vendredis en folie en pièce à mouche. Enfin, je pourrais te dire que l'écriture de la thèse sera facile, mais soyons franche, tu sais que c'est un mensonge, alors courage, je sais que tu y arriveras! **Aymeric**, merci pour ta bonne humeur et tes conseils à chacun de mes problèmes avec les manips. **Patricia, Maria-Rosa et Rana**, merci pour toutes ces discussions pendant les pauses déjeuner qui nous permettent de décompresser.

Je remercie aussi les autres personnes de cet institut. Je pense surtout à **Marianne** de l'équipe Cavalli, avec qui c'est toujours un plaisir de discuter et de rire. Courage on va s'en



sortir. A **Romain, Flavie** et **Antoine** de l'équipe Pasero dont la bonne humeur est toujours contagieuse. A **Kader**, dont le rire est toujours communicatif. A **Anne-Pascale**, tu es quelqu'un de génial, toujours agréable et souriante, ça a été un bonheur de te côtoyer durant ces quelques années. **Stéphanie** et **Fabienne**, de la cuisine à mouche, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Je remercie aussi les membres de l'équipe de **Marie-Laure Parmentier, Laurent** et **Sophie**, avec qui les échanges scientifiques ont toujours été un plaisir.

Je pense aussi à mes amis, arrivés dans ma vie bien avant la thèse. Je pense notamment à **Alice**, merci d'avoir toujours accepté mes choix même si je sais que ce n'est pas ceux que tu aurais fait. A **Claire**, on se ressemble tout en étant tellement différente. L'une des bonnes choses de nos années fac aura été notre amitié, qui tient malgré la distance. A **Chloé**, ensemble nous avons affronté les difficultés du Master, de la sélection du concours, et de la thèse. Merci de m'avoir prouvé que si on le veut, on peut tout faire.

Pour finir, je tiens à remercier tout spécialement ma famille. Mes **parents** qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes choix. **Candice**, ma petite sœur squatteuse, je t'adore malgré ton caractère pas facile. **Simon** et **Carla**, merci d'être toujours là pour moi et d'essayer de comprendre l'importance de mon travail. Merci à vous de repositionner mes priorités régulièrement.

Votre soutien et vos encouragements ont été essentiels tout au long de ma thèse.  
Encore une fois MERCI





2.2.2	<u>Rôle d'APPL dans la synaptogénèse et le transport axonal</u> .....	50
-------	---	----



2.2.3	<u>Rôle d'APPL dans la survie neuronale</u>	52
2.2.4	<u>Rôle d'APPL dans la mémoire</u>	56
2.2.5	<u>Rôle d'APPL dans le comportement</u>	58
<b>3.</b>	<b><u>La voie PCP</u></b>	<b>60</b>
3.1	<u>Fonction</u>	60
3.2	<u>Les membres de la voie PCP dans les neurones <math>\alpha/\beta</math> de drosophile</u>	62
3.2.1	<u>Les récepteurs : <i>Appl</i>, <i>fz</i> et <i>Vang</i></u>	62
3.2.2	<u>Le gène <i>dsh</i></u>	64
3.2.3	<u>Le gène <i>Abl</i></u>	66
3.2.3.1	<u>Rôle oncogénique d'<i>Abl</i> chez l'homme</u>	68
3.2.3.2	<u>Rôle d'<i>Abl</i> pendant le développement</u>	70
3.2.3.3	<u>Fonction d'<i>Abl</i> dans les maladies neurodégénératives</u>	70
<b>4.</b>	<b><u>Le gène <i>htt</i></u></b>	<b>72</b>
4.1	<u>Rôle de son homologue HTT chez l'homme</u>	72
4.1.1	<u>Structure de la protéine HTT</u>	72
4.1.2	<u>La maladie d'Huntington</u>	76
4.1.3	<u>Rôle physiologique</u>	78
4.1.3.1	<u>Fonction dans le développement</u>	78
4.1.3.2	<u>Effet anti-apoptotique d'HTT</u>	80
4.1.3.3	<u>Régulation de la transcription</u>	80
4.1.3.4	<u>Interaction sur le cytosquelette : impact sur le trafic vésiculaire</u>	82
4.2	<u>Fonctions connues d'<i>htt</i> chez la drosophile</u>	82



5. <b><u>Le gène <i>arm</i></u></b> .....	86
5.1 <u>Rôle d'<i>arm</i> dans la voie des Wnt</u> .....	88
5.2 <u>Rôle d'<i>arm</i> dans les jonctions adhérentes</u> .....	92
<b><u>Contexte et Objectifs de Travail</u></b> .....	96
<b><u>Résultats</u></b> .....	100
1. <b><u>Régulation d'ABL par des protéines associées à des neurodégénérescences, APPL et HTT, pour le développement des MB dans le cerveau de drosophile</u></b> .....	100
1.1 <u>Le mutant <i>Appl<sup>d</sup></i> est sauvé par la perte de fonction partielle d'<i>htt</i></u> .....	100
1.2 <u><i>htt</i> interagit génétiquement avec la voie PCP dans les neurones <math>\alpha/\beta</math></u> .....	106
1.3 <u>Interaction génétique entre <i>Appl</i>, <i>Abl</i> et <i>htt</i></u> .....	108
1.4 <u><i>Abl</i> : acteur indispensable du développement des neurones <math>\alpha/\beta</math> des MB</u> .....	110
1.4.1 <u>Analyse du mutant <i>Abl</i></u> .....	112
1.4.2 <u>Analyse de la surexpression d'<i>Abl</i></u> .....	114
1.4.3 <u>Analyse des clones MARCM canoniques <i>Abl</i></u> .....	116
1.4.4 <u>Analyse de l'expression d'ABL</u> .....	118
1.5 <u><i>Abl</i> interagit génétiquement avec <i>htt</i></u> .....	120
1.5.1 <u>Analyse du double mutant <i>Abl htt</i></u> .....	120
1.5.2 <u>Analyse de la double surexpression</u> .....	122
1.6 <u>HTT régule l'activité d'ABL</u> .....	124
1.7 <u>HTT n'affecte ni la quantité, ni la localisation d'ABL</u> .....	126
1.8 <u>Conclusion</u> .....	128



<b>2. <u>Collaboration entre <i>App1</i> et <i>arm</i> via sa fonction dans les jonctions adhérentes pour le développement des neurones</u></b> .....	130
2.1 <u>Analyse du phénotype mutant et de la surexpression <i>arm</i></u> .....	130
2.2 <u>Analyse de l'interaction génétique entre <i>App1</i> et <i>arm</i></u> .....	132
2.3 <u>Analyse des interactions génétiques entre <i>arm</i> et les membres de la voie PCP</u> .....	134
2.4 <u>Analyse de l'expression de différentes formes <i>arm</i> dans les MB</u> .....	136
2.5 <u>Conclusion</u> .....	138
<b>3. <u>Création de nouveaux allèles mutants <i>App1</i> par la technique du CRISPR-Cas9</u></b> .....	140
3.1 <u>Analyse moléculaire du mutant <i>App1<sup>d</sup></i></u> .....	141
3.2 <u>Analyse du mutant <i>App1<sup>c1.4</sup></i></u> .....	144
3.3 <u>Analyse du mutant <i>App1<sup>c2.1</sup></i></u> .....	148
3.4 <u>Conclusion</u> .....	148
<b>4. <u>Résultats supplémentaires</u></b> .....	152
4.1 <u>Le gène <i>App1</i></u> .....	152
4.1.1 <u>Analyse du phénotype du mutant <i>App1<sup>d</sup></i> dans les MB</u> .....	152
4.1.2 <u>Différence de pénétrance du phénotype entre mâle et femelle</u> .....	154
4.1.3 <u>Clones MARCM canoniques et de visualisation</u> .....	154
4.1.4 <u>Analyse de la surexpression d'<i>App1</i> dans les MB</u> .....	156
4.1.5 <u>Expériences de sauvetage du mutant <i>App1</i> avec différentes constructions exprimant <i>App1</i></u> .....	156
4.1.6 <u>Expériences de sauvetage du mutant <i>App1</i> avec la forme humaine APP</u> .....	158
4.1.7 <u>Expériences d'interaction du mutant <i>App1</i> avec différentes constructions UAS d'<i>Aβ</i></u> .....	160



4.2	<u>Le gène <i>dsh</i></u> .....	164
4.2.1	<u>Analyse du phénotype du mutant et de la surexpression <i>dsh</i></u> .....	164
4.2.2	<u>Analyse des clones MARCM canoniques <i>dsh</i><sup>1</sup></u> .....	166
4.2.3	<u>Interaction génétique entre <i>Appl</i> et <i>dsh</i></u> .....	168
4.3	<u>Le gène <i>Abl</i></u> .....	172
4.3.1	<u>Interaction génétique entre <i>Appl</i> et <i>Abl</i></u> .....	172
4.3.2	<u>Interaction génétique entre <i>Appl</i>, <i>dsh</i> et <i>Abl</i></u> .....	174
4.3.2.1	<u>Interaction génétique entre <i>dsh</i> et <i>Abl</i></u> .....	174
4.3.2.2	<u>Interaction génétique entre <i>Appl</i>, <i>dsh</i> et <i>Abl</i></u> .....	176
4.4	<u>Le gène <i>htt</i></u> .....	180
4.4.1	<u>Analyse de l'expression des formes humaines <i>htt</i> dans les MBs</u> .....	180
4.4.2	<u>Analyse des interactions génétiques entre <i>Abl</i> et <i>htt</i></u> .....	182
4.5	<u>Le gène <i>DAAM</i></u> .....	184
4.6	<u>Les gènes <i>wnt4</i> et <i>wnt5</i></u> .....	188
4.6.1	<u>Analyse des phénotypes mutants</u> .....	188
4.6.2	<u>Analyse des interactions génétiques entre <i>Appl</i> et <i>Wnt5/4</i></u> .....	190
4.6.3	<u>Analyse des interactions génétiques entre la voie PCP et <i>Wnt4</i></u> .....	192
4.6.4	<u>Sauvetage du mutant <i>Appl</i><sup>d</sup> par la surexpression de <i>Wnt4</i> ou <i>Wnt5</i></u> .....	192





4.7 <u>Les gènes <i>drl</i> et <i>Drl2</i></u> .....	194
4.7.1 <u>Analyse des clones MARCM de visualisation <i>Appl<sup>d</sup></i> affectant le développement du lobe <math>\alpha</math></u> .....	194
4.7.2 <u>Analyse de l'interaction génétique entre <i>Appl</i> et <i>drl</i></u> .....	196
4.7.3 <u>Analyse de l'interaction génétique entre <i>Appl</i> et <i>Drl2</i></u> .....	196
<b><u>Discussion</u></b> .....	198
1. <u>Régulation d'ABL par des protéines associées à des neurodégénérescences, APPL et HTT, pour le développement des MB dans le cerveau de drosophile</u> .....	198
2. <u>Collaboration entre <i>Appl</i> et <i>arm</i> via sa fonction dans les jonctions adhérentes pour le développement des neurones</u> .....	206
3. <u>Création de nouveaux allèles mutants <i>Appl</i> par la technique du CRISPR-Cas9</u> .....	212
<b><u>Matériels et méthodes</u></b> .....	220
1. <u>Souches et croisements</u> .....	220
2. <u>Système UAS-GAL4</u> .....	220
3. <u>Système MARCM</u> .....	222
4. <u>Dissections</u> .....	222
5. <u>Analyse des mushroom bodies</u> .....	224
6. <u>Immunomarquage</u> .....	224
7. <u>CRISPR-Cas9</u> .....	226
<b><u>Bibliographie</u></b> .....	228
<b><u>Publication Annexe</u></b> .....	244



## Liste des abréviations

Abréviations	Nom Complet
A $\beta$	Peptide Amyloïd $\beta$
<i>Abl</i>	<i>Abelson Tyrosine Kinase</i>
AICD	APP IntraCellular Domain
AMPA	acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
APC	Adenomatous Polyplsis Coli
APF	After Puparium Formation
APP	Amyloïd Precursor Protein
APLP1/2	Amyloïd Precursor-Like Protein 1/2
<i>Appl</i>	<i>Amyloïd Precursor Protein-Like</i>
<i>Arg</i>	<i>Abl-related gene</i>
ARM	Anesthesia-Resistant Memory
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>
ARNi	ARN interférence
BCR	Breakpoint Cluster Region
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindroic Repeats
cs	Canton-S
CSN	Cellules Souches Neuronales
DAAM	Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis
<i>Dab</i>	<i>disabled</i>
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
<i>dgo</i>	<i>diego</i>
<i>drl/llo</i>	<i>derailed / linotte</i>
<i>Drl2</i>	<i>Derailed-2</i>
<i>dsh</i>	<i>dishevelled</i>
<i>elav</i>	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
FABD	F-Actin Binding Domain
<i>FasII</i>	<i>FasciclinII</i>
<i>fmi</i>	<i>flamingo</i>
<i>fr</i>	<i>frizzled</i>
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRT	Flipase Recognition target
GFP	Green Fluorescent Protein
GFR	Growth Factor Receptor
GMC	Ganglion Mother Cell
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
HEAT	Huntingtine, facteur d'Elongation, protéine Phosphatase 2A, TOR1
<i>htt</i>	<i>huntingtin</i>
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LAL	Leucémie aigüe lymphoblastique
LMC	Leucémie myéloïde chronique



LRP5/6	Low density lipoprotein Receptor-related Protein
LTM	Long-Term Memory
MA	Maladie d'Alzheimer
MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
MB	Mushroom Body
MH	Maladie de Huntington
MSO	Mechano Sensory Organs
MTM	Middle-Term Memory
NB	Neuroblaste
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain reaction
<i>pk</i>	<i>prickle</i>
PP	Domaine PolyProline
PS1	préséniline1
sg-RNA	synthetic guide RNA
SH2/3	Src homology Domain 2/3
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
STM	Short-Term Memory
TCF/Lef	T Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor
UAS	Upstream Activator Sequence
<i>Vang</i>	<i>Van Gogh</i>
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defective</i>



# Introduction

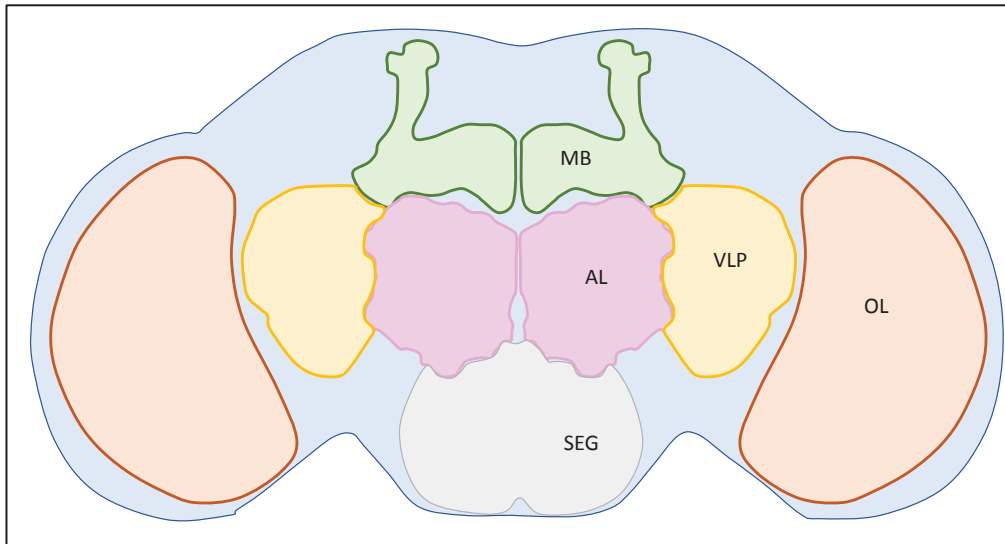
## **1. Le développement du système nerveux chez la drosophile**

Le système nerveux est l'un des organes les plus complexes et fascinants à étudier. Le développement de plusieurs millions d'axones et la mise en place d'autant de connections nerveuses démontrent toute la complexité et la précision déployée par le cerveau lors de son développement.

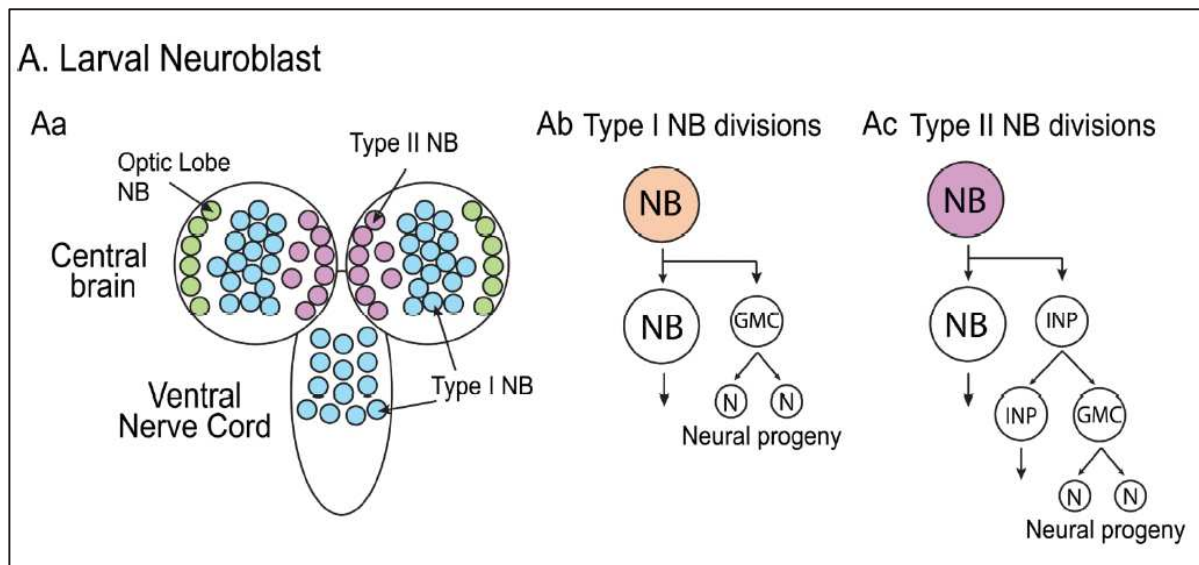
Afin de faciliter au mieux l'étude des différents mécanismes mis en jeu pendant le développement du cerveau, nous nous sommes servis des nombreux atouts que le modèle de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) pouvait apporter. Hormis son cycle de reproduction rapide, le modèle drosophile possède des outils génétiques puissants, tels que le système UAS-GAL4 ou encore le MARCM, permettant l'étude *in vivo* des différents mécanismes développementaux. D'un point de vue génétique, la drosophile est probablement l'un des organismes modèles les plus adéquats, disposant d'un génome entièrement séquencé et annoté, réparti sur seulement quatre chromosomes. De plus, la faible redondance génétique de ce modèle facilite grandement l'étude fonctionnelle des différents gènes impliqués dans le développement.

### **1.1 Le cerveau**

Comparé aux vertébrés, la drosophile présente certains avantages quant à l'étude de son système nerveux. Outre la simplification de son développement et son nombre inférieur



**Figure 1 :** Schéma d'un cerveau adulte de drosophile. Le cerveau adulte se compose de différentes structures : les lobes optiques (OL), les lobes antennaires (AL), les mushroom bodies (MB), les ventro-latéral protocerebrum (VLP), le subesophageal ganglion (SEG)...



**Figure 2 :** Neurogénèse du cerveau de drosophile à l'état larvaire. Chaque hémisphère est composé de 100 neuroblastes, divisés en deux groupes : neuroblaste de type I et neuroblaste de type II. Alors que les neuroblastes de type I se divisent pour donner un autre neuroblaste et une GMC qui donnera deux progéniteurs neuronaux, la division des neuroblastes de type II donnera un neuroblaste et un progéniteur intermédiaire (INP), qui donnera un nouveau INP et une GMC. Cela permet d'amplifier fortement le nombre de progéniteurs neuronaux. (Schéma issu de l'article de Mohwi & Doe 2013).



de neurones (environ 100 000 contre environ 100 milliards chez l'homme), le cerveau de la drosophile a l'avantage d'avoir été entièrement cartographié, définissant à chaque région (lobes optiques, lobes antennaires ou encore corps pédonculés) une fonction précise (**Figure 1**).

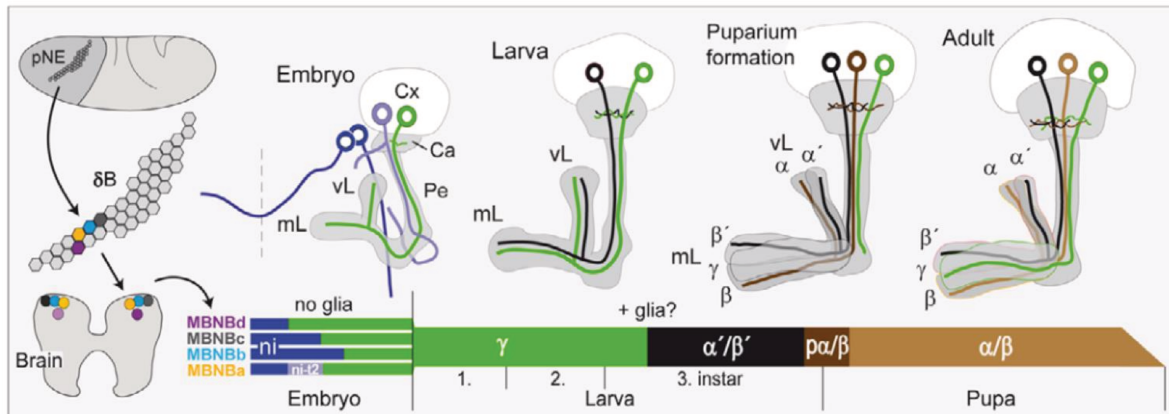
Le développement du cerveau démarre dès le stade embryonnaire, avec la division successive des quelques 200 neuroblastes mis en jeu. Ces neuroblastes sont répartis de façon symétrique dans les deux hémisphères, et se divisent de façon asymétrique afin de produire un nouveau neuroblaste et une Ganglion Mother Cell (GMC). Cette GMC subit ensuite une nouvelle division pouvant donner cette fois-ci deux neurones ou un neurone et une cellule gliale. Ces divisions successives perdurent tout au long du développement larvaire et pupal afin d'aboutir à un cerveau fonctionnel (Bello *et al.*, 2008 ; Ceron *et al.*, 2001) (**Figure 2**).

## **1.2 Les mushroom bodies**

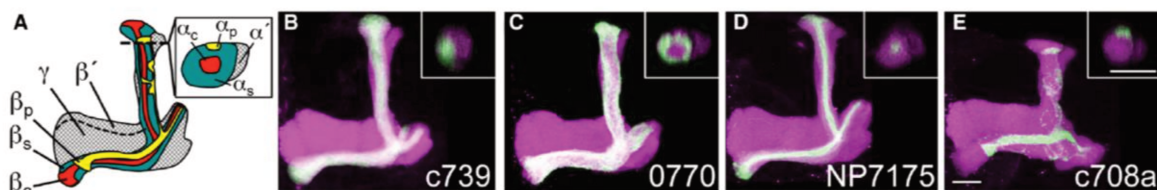
### **1.2.1 Développement**

Les mushroom bodies (MB) ou corps pédonculés sont une structure symétrique au centre du cerveau de la drosophile, décrite pour la première fois par Félix Dujardin en 1850. Chaque MB est composé d'environ deux mille neurones, aussi appelés cellules de Kenyon (Kenyon F.C., 1896). Ce sont des neurones unipolaires caractérisés par la présence de dendrites, ou calyx, formées sous le corps cellulaire, et suivies du prolongement axonal.

Les neurones des MB sont issus de la division de quatre neuroblastes dans chaque hémisphère. Ces quatre neuroblastes donneront lieu, au cours du développement, aux trois types de neurones : les neurones  $\gamma$ , les neurones  $\alpha'/\beta'$  et les neurones  $\alpha/\beta$  (Ito, K., 1997 ; Lee *et al.* 1999) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Développement des mushroom bodies.** Les neurones des MB se développent à partir de quatre neuroblastes dès le stade embryonnaire. Chacun des neuroblastes commence par former les neurones  $\gamma$ , et cela jusqu'au début du 3eme stade larvaire. C'est à ce stade que commence le développement des neurones  $\alpha'/\beta'$ . Au moment de la formation de la pupa, les neurones  $\alpha'/\beta'$  ont fini de se développer et commence alors le développement des neurones  $\alpha/\beta$  qui durera jusqu'à l'éclosion de la pupa pour donner un adulte. A la fin du développement, nous retrouvons cinq lobes : deux lobes verticaux  $\alpha$  et  $\alpha'$  (vL) et trois lobes médians  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\gamma$  (mL). (Schéma issu de l'article de Kunz *et al.* 2012)

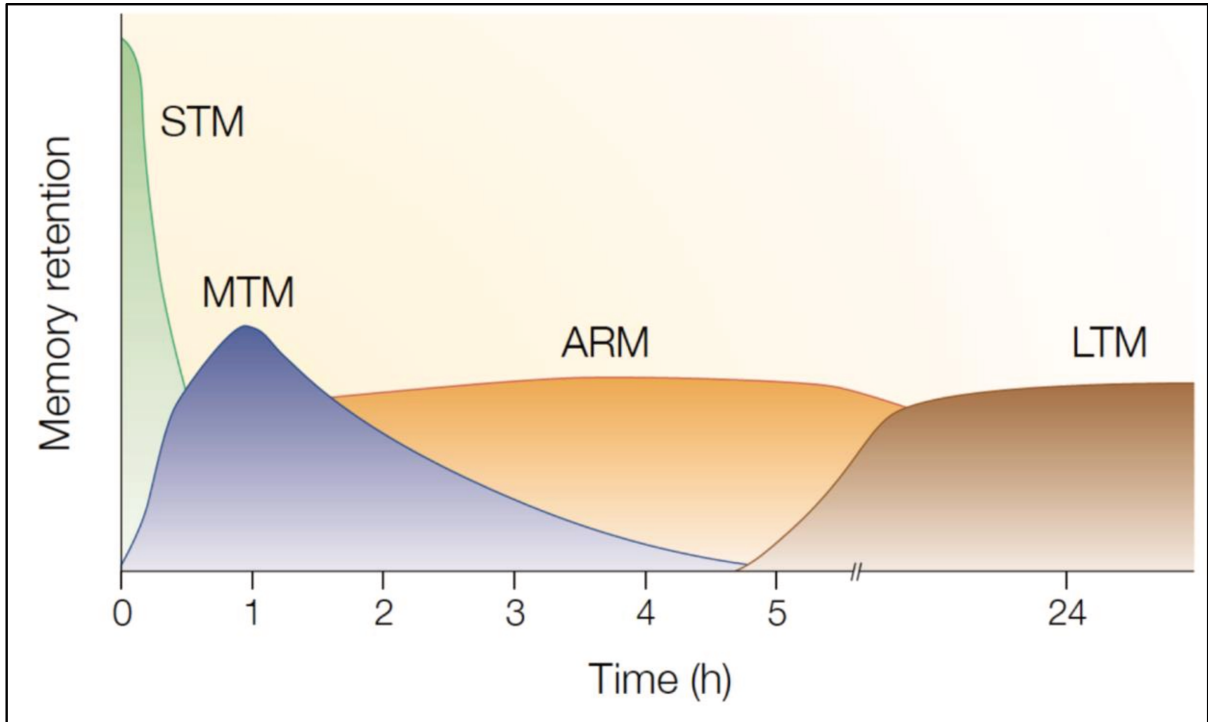


**Figure 4 : Les neurones  $\alpha/\beta$ .** (A) Représentation schématique des neurones  $\gamma$ ,  $\alpha'/\beta'$  et  $\alpha/\beta$  chez l'adulte. Ces derniers sont composés de trois sous populations neuronales :  $\alpha/\beta_p$  = neurones  $\alpha/\beta$  pionniers,  $\alpha/\beta_s$  = neurones  $\alpha/\beta$  de surface,  $\alpha/\beta_c$  = neurones  $\alpha/\beta$  centraux. (B-E) Projection d'un stack confocal de MB adulte. Le magenta correspond à l'expression de LexAop-rCD2::RFP sous le contrôle de MB247-LexA::VP16 qui permet l'observation de l'ensemble des MB. (B) La construction c739-Gal4 permet l'expression de l'UAS-mCD8::GFP dans l'ensemble des neurones  $\alpha/\beta$ . (C) La construction 0770-Gal4 permet l'expression de l'UAS-mCD8::GFP majoritairement dans les neurones  $\alpha/\beta$  de surface et plus faiblement dans les neurones  $\alpha/\beta$  pionniers. (D) La construction NP7175-Gal4 permet l'expression de l'UAS-mCD8::GFP dans les neurones  $\alpha/\beta$  centraux. (E) La construction c739-Gal4 permet l'expression de l'UAS-mCD8::GFP dans l'ensemble des neurones  $\alpha/\beta$  pionniers. (Figure issue de l'article de Perisse *et al.* 2013.)

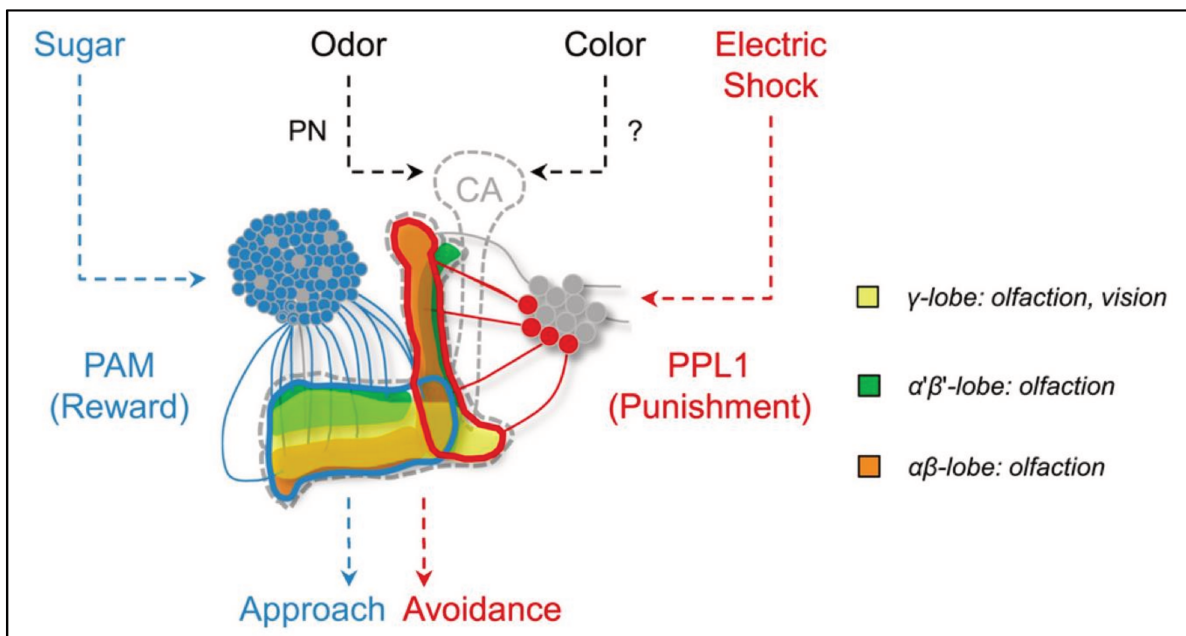
Au début du stade larvaire, les MB ne sont composés que des neurones  $\gamma$ . Ceux-ci sont dits branchés, c'est à dire que les corps cellulaires de ces neurones projettent leurs axones en un faisceau de fibres appelé pédoncule, jusqu'à un point défini, dit le point de branchement. C'est à partir de celui-ci que chaque axone se séparera en deux branches distinctes, l'une projetant dorsalement, et l'autre médialement. Au moment du troisième stade larvaire, les neurones  $\alpha'/\beta'$  commencent à se développer. Ces neurones ont aussi la particularité de voir leurs axones se séparer en deux branches : la branche  $\alpha'$  dorsalement et la branche  $\beta'$  médialement. Au passage du stade larvaire au stade pupal, les premiers neurones  $\alpha/\beta$ , appelés neurones pionniers  $\alpha/\beta$ , commencent à se développer. Au même stade, les neurones  $\gamma$  subissent un remodelage. Les deux branches de ces neurones dégèrent afin d'être totalement élaguées. Seuls les corps cellulaires et le pédoncule de ces neurones subsistent, afin de permettre par la suite la repousse d'une branche médiale unique. En parallèle de ce phénomène au stade pupal, l'ensemble des neurones  $\alpha/\beta$  se développent. Leurs axones sont eux aussi branchés, avec une branche dorsale  $\alpha$ , et une branche  $\beta$  médiale.

A l'âge adulte, les MB présentent cinq lobes : dorsalement, nous retrouvons les lobes  $\alpha$  et  $\alpha'$ , alors que médialement nous avons les lobes  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\gamma$ .

Les neurones se développent de façon successive, quel que soit leur type. Par exemple, tous les neurones  $\alpha/\beta$  (environ 1 000 neurones) ne se développent pas de façon synchronisée, mais les uns après les autres. Les premiers neurones (neurones pionniers) forment un faisceau d'axones dans lequel pousseront successivement tous les autres axones. Ainsi les axones des neurones les plus jeunes (aussi nommés neurones centraux  $\alpha/\beta$ ) seront situés au centre du faisceau alors que les plus vieux (les neurones  $\alpha/\beta$  de surface) seront en périphérie. Chacune des catégories de neurones peut être spécifiquement marquée grâce à des lignées GAL4 (Aso *et al.* 2009) (**Figure 4**).



**Figure 5 : Les différentes phases de la mémoire après un conditionnement au choc électrique.** La mémoire à court terme (STM) dure environ 1 heure après conditionnement, alors que les mémoires à moyen terme (MTM) et résistante à l'anesthésie (ARM) peuvent durer plusieurs heures. La mémoire à long terme (LTM) peut durer quant à elle jusqu'à deux jour, et nécessite une synthèse protéique *de novo*. (Schéma issu de l'article de Heisenberg 2003.)



**Figure 6 : Les différents paradigmes conditionnant la mémoire.** Les informations olfactives et visuelle convergent vers les différents types de neurones des MB. Alors que les informations olfactives sont transmises par les neurones de projections (PN), il n'a pas encore été identifié les neurones transmettant les informations visuelles. Ces informations sont ensuite traitées par différentes catégories de neurones dopaminergiques (PAM et PPL1) afin de répondre de façon appropriée (attraction ou répulsion) au stimulus. (Schéma issu de l'article de Vogt *et al.* 2014.)

### 1.2.2 Fonction

Différentes études ont démontré le rôle des MB dans la mémoire olfactive et l'apprentissage (Heisenberg *et al.* 1985 ; De Belle & Heisenberg 1994 ; McBride *et al.* 1999). Toutefois, l'absence de MB n'affecte ni la viabilité, ni la reproduction. Si on les compare aux cerveaux de mammifères, les MB se rapprochent de l'hippocampe et/ou du cervelet (Strausfeld *et al.* 1998).

Chez la drosophile, la mémoire liée à l'olfaction peut être déclinée selon quatre types : la mémoire à long terme (LTM), la mémoire à court terme (STM), la mémoire à moyen terme (MTM) et la mémoire résistante à l'anesthésie (ARM) (**Figure 5**). Différents paradigmes peuvent être utilisés afin d'étudier chacune de ces mémoires. Ainsi le paradigme de la mémoire appétitive associe une odeur à une récompense (sucre), alors que le paradigme de la mémoire aversive l'associe à une punition (choc électrique). Différents protocoles d'entraînement peuvent être mis en place afin d'étudier indépendamment chacun des trois types de mémoire (**Figure 6**).

L'utilisation de ces paradigmes a permis de démontrer que les différents types de neurones des MB interviennent dans l'une ou l'autre des mémoires chez la drosophile. Ainsi, alors que les neurones  $\gamma$  sont associés à la mémoire à court terme, les neurones  $\alpha/\beta$  sont spécialisés dans la mémoire à long terme. Les neurones  $\alpha'/\beta'$  sont quant à eux associés à la consolidation de la mémoire (Blum *et al.* 2009 ; Trannoy *et al.* 2011 ; Redt-Clouet *et al.* 2012).

Durant ma thèse, je me suis concentrée sur la compréhension du développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. Pour cela, je me suis focalisée sur le rôle et les interactions des protéines APPL, DSH, ABL, HTT et ARM dans la croissance de ces neurones. Le reste de cette



introduction sera une description de ces différentes protéines, et de leurs rôles pathologiques et physiologiques chez l'homme et la drosophile.

## **2. Le gène *Appl* et son homologue humain APP**

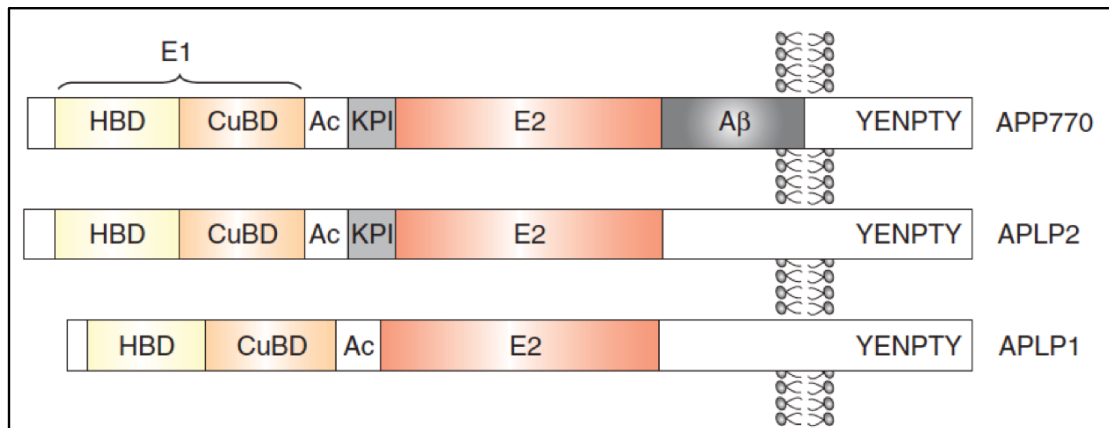
Au sein du laboratoire de Jean-Maurice Dura, nous nous sommes intéressés à la fonction de la protéine APPL (Amyloid Precursor Protein Like) dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Cette protéine est l'homologue de la protéine de mammifère APP (Amyloid Precursor Protein). Cette dernière a été largement étudiée depuis les trente dernières années pour son rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

### **2.1 Rôle de la protéine APP chez l'homme**

Rapidement après la découverte du gène codant APP par Kang *et al.* en 1987, il a été mis en évidence une conservation forte de ce dernier au cours de l'évolution. De plus, il a été identifié chez les mammifères deux gènes codant pour des homologues d'APP : APLP1 et APLP2 (Wasco W *et al.* 1992 ; Wasco W *et al.* 1993).

Différentes isoformes du gène APP sont produites lors de l'épissage (Beyreuther *et al.* 1993). Si l'expression du gène APP semble être ubiquitaire, les isoformes de la protéine semblent être spécifiques à certains tissus. Ainsi, il a été montré que l'isoforme APP<sup>695aa</sup> est spécifique des cellules neuronales (Kang *et al.* 1987 ; Tanaka *et al.* 1989).

L'étude de Clarris *et al.* en 1995 a permis de montrer une augmentation de l'expression d'APP pendant le développement neuronal chez le rat, suggérant une fonction d'APP dans la croissance cellulaire. Cependant, la création de souris KO pour le gène APP a montré que la perte de cette protéine n'entraîne aucune létalité, ni stérilité. Cette absence de phénotype



**Figure 7 : Représentation schématique des protéines de la famille APP chez les mammifères.** Les protéines de cette famille partagent des domaines conservés : un domaine E1 composé d'un domaine liant l'héparine (HBD), d'un domaine liant le cuivre (CuBD) ; d'un domaine acide (Ac) ; d'un domaine inhibiteur de protéase de type Kunitz (KPI) excepté pour APLP1 ; un domaine E2 ; un motif YENPTY en région intracellulaire. Le domaine Aβ n'est retrouvé que chez la protéine APP. (Figure issue de l'article de Müller & Zheng 2012.)



chez le mutant est sûrement due à une redondance fonctionnelle des protéines APLP1 et APLP2, ce qui complique l'analyse de la fonction d'APP *in vivo*. Ceci a été confirmé par les double mutants APP/APLP2 et APLP1/APLP2 qui présentent une létalité post-natale (Heber *et al.* 2000).

### **2.1.1 Structure de la protéine APP**

La protéine APP se présente comme une protéine transmembranaire de la famille de type I, avec un seul domaine transmembranaire, une large région N-terminale ectoplasmique et une plus courte région C-terminale cytoplasmique (**Figure 7**). On retrouve différents domaines conservés entre espèces.

Dans la partie extracellulaire, nous retrouvons deux domaines : E1 et E2, qui peuvent être chacun divisé en sous domaines. Le domaine E1 est composé de deux régions distinctes : un domaine liant l'héparine (HBD) et un domaine liant le cuivre (CuBD). Ces domaines de liaison suggèreraient qu'APP soit un récepteur (Rossjohn *et al.* 1999). Le domaine E1 est suivi d'une région riche en résidus d'acides aspartique et glutamique, dont la fonction n'a pas été mise en évidence à ce jour. Dans toutes les isoformes, exceptée l'isoforme neuronale APP<sup>695aa</sup>, cette région est suivie par un domaine inhibiteur de protéase de type Kunitz (KPI). Il est possible que ce domaine soit lié à la fonction d'APP dans la croissance cellulaire. Le domaine E2, quant à lui, est composé d'un deuxième domaine HBD. Ce domaine est riche en double hélices  $\alpha$ , qui sont capable de se dimériser, et pourrait donc amener l'hypothèse d'une dimérisation d'APP avec lui-même (Xue *et al.* 2011). Le dernier domaine majeur de la partie extracellulaire d'APP est le domaine A $\beta$ , s'étendant jusqu'à la région transmembranaire. La protéine APP subit différents évènements de protéolyse pouvant libérer ce fragment



susceptible de conduire à la formation des plaques amyloïdes, constituants majeurs de la maladie d'Alzheimer (Cette partie sera développée plus précisément ultérieurement).

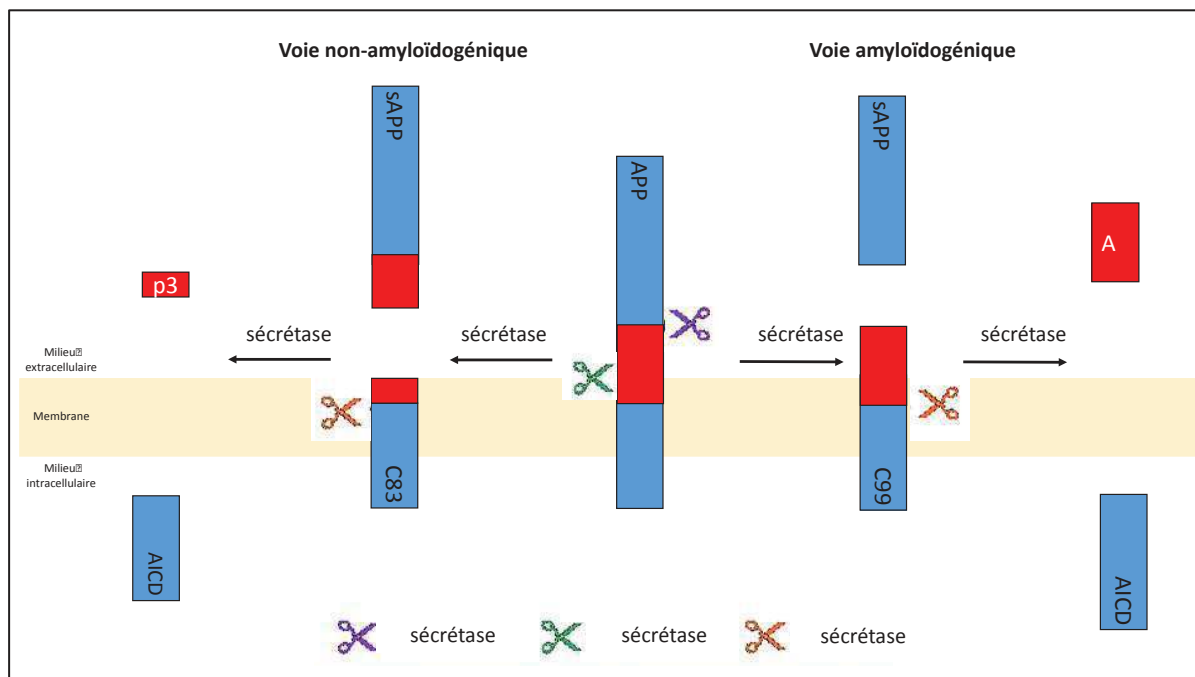
Enfin, dans la partie intracellulaire nous retrouvons un motif YENPTY, fortement conservé au cours de l'évolution. Plusieurs études ont démontré l'importance de ce motif d'interaction protéique dans la régulation du transport et de l'endocytose d'APP, impliqué dans le renouvellement de la protéine (Lai *et al.* 1995 ; Perez *et al.* 1999 ; Ring *et al.* 2007).

### **2.1.2 Modifications protéolytiques d'APP**

Le long de la protéine APP sont retrouvés différents sites de clivage, tous ciblés par une sécrétase spécifique. On dénombre trois différentes sécrétases :  $\alpha$ -sécrétase,  $\beta$ -sécrétase,  $\gamma$ -sécrétase. L'action de ces différentes sécrétases permet la production de fragments d'APP, pouvant ou non être toxique. En effet, le clivage d'APP se fait selon deux voies : la voie amyloïdogénique faisant intervenir une  $\beta$ -sécrétase, et la voie non-amyloïdogénique, faisant intervenir une  $\alpha$ -sécrétase (**Figure 8**).

#### **2.1.2.1 La voie non amyloïdogénique**

Le clivage d'APP via la voie non amyloïdogénique fait intervenir l' $\alpha$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase. Le site de clivage par l' $\alpha$ -sécrétase est relativement proche du domaine transmembranaire, dans la région A $\beta$ . Ce clivage par l' $\alpha$ -sécrétase permet d'empêcher la formation de ce peptide A $\beta$ , et engendre la formation d'un fragment soluble, sAPP $\alpha$  et un fragment toujours lié à la membrane, C83. Ce clivage d'APP au niveau du site  $\alpha$  se produit dans différents compartiment cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) mais aussi à la membrane cellulaire (Nunan & Small, 2000 ; Parvathy *et al.* 1999). Suite à ce clivage,



**Figure 8 : Représentation schématique des modifications protéolytiques d'APP.** La voie non-amyloïdogénique se traduit par l'action successive des enzymes α-sécrétase et γ-sécrétase, menant à la production d'un fragment sécrété sAPPα, d'un petit fragment p3 et d'un fragment intracellulaire AICD. La voie amyloïdogénique se traduit par l'action successive des enzymes β-sécrétase et γ-sécrétase, menant à la production d'un fragment sécrété sAPPβ, d'un fragment toxique Aβ et d'un fragment intracellulaire AICD.

le fragment C83 subit un autre clivage, par une  $\gamma$ -sécrétase. Le site de clivage par la  $\gamma$ -sécrétase se trouve à l'extrémité C-terminale de la région A $\beta$ . Contrairement à l' $\alpha$ -sécrétase, le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase ne se produirait qu'à la membrane plasmique et dans les endosomes (Xia *et al.* 1997 ; Weidemann *et al.* 1997). Cela permet de libérer un fragment exprimant le reste du domaine A $\beta$ , p3 et un fragment exprimant tout le domaine intracellulaire, AICD (APP IntraCellular Domain) (**Figure 8**).

### **2.1.2.2 La voie amyloïdogénique**

Le clivage d'APP selon la voie amyloïdogénique fait intervenir, quant à lui, la  $\beta$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase. Le site de clivage par la  $\beta$ -sécrétase se situe à l'extrémité N-terminale de la région A $\beta$ . Ce clivage par la  $\beta$ -sécrétase engendre lui aussi la formation d'un fragment soluble, sAPP $\beta$  et d'un fragment toujours lié à la membrane, C99. Ce clivage se produit dans les mêmes compartiments cellulaires que celui engendré par l' $\alpha$ -sécrétase, c'est à dire dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les vésicules de sécrétion et à la membrane cellulaire (Huse *et al.* 2000). Le fragment C99 ainsi généré subit ensuite un clivage par une  $\gamma$ -sécrétase à l'extrémité C-terminale de la région A $\beta$ . Cela permet de libérer le peptide A $\beta$  ainsi qu'un fragment exprimant tout le domaine intracellulaire, AICD.

Il est important de noter que la  $\gamma$ -sécrétase possède quant à elle deux sites de clivage, situés à deux acides aminés l'un de l'autre, permettant de produire deux fragments de longueurs différentes : A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Ce sont ces fragments qui forment le cœur des plaques amyloïdes, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (**Figure 8**).



### **2.1.2.3 La balance entre ces deux voies : La maladie d'Alzheimer**

Ces deux voies protéolytiques amyloïdogénique et non amyloïdogénique affectent APP selon un processus métabolique normal (Haass *et al.* 1992). Les différents fragments solubles et intracellulaires provenant de l'une ou l'autre des voies possèdent des fonctions physiologiques propres. Toutefois, il existe un équilibre entre ces deux voies. Lorsque cet équilibre est dérégulé, des défauts apparaissent avec notamment la formation des plaques amyloïdes. Il existe une compétition entre l' $\alpha$ -sécrétase et la  $\beta$ -sécrétase. Ainsi, lorsque l'on surexprime l'une ou l'autre des sécrétases, on va favoriser la voie correspondante (Vassar *et al.* 1999 ; Luo *et al.* 2001). Ce déséquilibre est l'une des hypothèses avancées pour expliquer la maladie d'Alzheimer. La voie amyloïdogénique serait favorisée par rapport à la voie non amyloïdogénique, ce qui engendrerait une trop forte production du peptide A $\beta$ , que la cellule ne serait plus capable d'éliminer. Ces peptides s'agrègent les uns aux autres, affectant le transport axonal et les contacts synaptiques, ce qui entraîne à terme une dégénérescence neuronale. Toutefois, il ne peut pas être négligé que, même si l'accumulation du peptide A $\beta$  est néfaste, la perte du fragment sAPP $\alpha$  et de son effet neuroprotecteur pourrait avoir un rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

### **2.1.3 Rôle physiologique**

Bien qu'APP ait été extensivement étudiée au cours des dernières décennies, la fonction physiologique de cette protéine n'a toujours pas été clairement établie à ce jour.

Des études en culture de cellules ont montré la capacité d'APP à potentialiser la croissance neuronale (Small *et al.* 1994 ; Allinquant *et al.* 1995) et la synaptogénèse. Pendant le développement, APP est exprimée en région pré et post-synaptique.





Cependant, une forte augmentation de la quantité de protéine durant la formation de la synapse est observée (Loffler & Huber 1992 ; Clarris *et al.* 1995). Chez la souris, Salbaum & Ruddle (1994) ont montré qu'APP s'exprime pendant le développement embryonnaire dans le tube neural, ce qui correspond au moment de la différenciation et de la croissance neuronale. Il a également été montré que l'expression d'APP est augmentée suite à une blessure axonale (Gentleman *et al.* 1993), ce qui laisse supposer qu'APP joue aussi un rôle dans le mécanisme de réparation. Des études chez la souris ont également permis d'avancer un rôle d'APP dans la croissance et le guidage axonal, en interaction avec le complexe DCC (Magara *et al.* 1999 ; Rama *et al.* 2012). Ces auteurs proposent qu'APP serait le récepteur de Netrin1 et agirait avec le complexe DCC pour permettre un guidage correct des neurones de la petite commissure ventrale de l'hippocampe.

En parallèle, il semblerait qu'APP ait un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neuronales (CSN). En effet, l'inhibition de l' $\alpha$ -sécrétase entraîne une diminution de la prolifération des CSN, qui peut être sauvée par la surexpression du fragment sAPP $\alpha$  (Demars *et al.* 2011). De plus, les cellules souches du SNC de souris surexprimant APP ont une propension plus grande à se différencier en neurones alors que celles provenant de souris APP-KO présentent une différenciation neuronale plus faible (Hu *et al.* 2013).

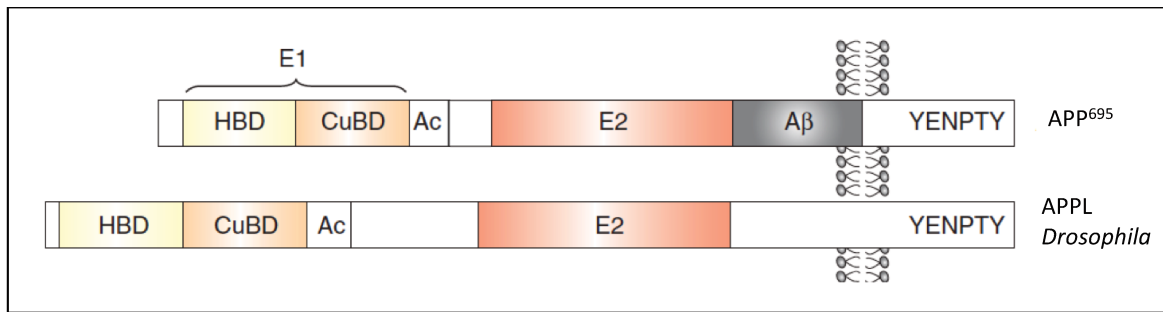
Différentes études mettent aussi en avant un effet des fragments issus de la protéolyse d'APP dans la croissance cellulaire. En effet, l'expression du fragment sAPP $\alpha$  dans un cerveau de souris ayant subi des lésions traumatiques permet d'améliorer la survie neuronale (Thornton *et al.* 2006). De plus, l'expression de ce même fragment chez les souris KO pour APP/APLP2 permet de sauver la létalité (Weyer *et al.* 2011). Cela démontre un effet de la partie extracellulaire d'APP pendant la croissance axonale.



En plus d'un rôle dans le développement neuronal, APP pourrait avoir une fonction dans la plasticité synaptique, régulant l'apprentissage et la mémoire. En effet, différentes études ont montré qu'APP pouvait altérer l'expression des récepteurs AMPA ou NMDA, conduisant à une dérégulation calcique au niveau de la synapse (Lee *et al.* 2010 ; Hoe *et al.* 2009 ; Cousins *et al.* 2009). Le rôle d'APP au niveau de l'activité synaptique a aussi été suggéré via un effet sur le transport axonal. En effet, APP a été retrouvé au niveau des éléments vésiculaires des dendrites et axones (Schubert *et al.* 1991).

Enfin, il a été mis en évidence un rôle d'APP dans l'adhésion cellulaire (Schubert *et al.* 1989). En plus du fait qu'APP puisse se lier à différents composants de la matrice extracellulaire (Narindrasorasak *et al.* 1992 ; Beher *et al.* 1996), les protéines APLP1 et APLP2, avec lesquelles APP peut se dimériser, sont capables d'induire des adhésions de cellule à cellule, en culture cellulaire (Soba *et al.* 2005)

Bien que chacune de ces études démontre un rôle potentiel dans le développement neuronal, nous ne savons que très peu de choses sur les mécanismes mis en place par cette protéine pour assurer sa fonction. Le fait qu'APP soit une protéine transmembranaire laisse supposer qu'un signal intracellulaire pourrait être activé. Une autre étude a permis d'identifier un peptide de 20 acides aminés dans la partie intracellulaire, capable de lier et d'activer une petite protéine G spécifique :  $G\alpha_o$  (Nishimoto *et al.* 1993). Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse qu'APP serait un récepteur couplé à une protéine G non conventionnel, permettant l'activation d'un signal de transduction (Okamoto *et al.* 1995). D'autres hypothèses faisant intervenir les différents fragments formés à partir d'APP ont aussi été proposées. Ainsi, le domaine AICD pourrait agir comme un facteur de transcription lorsqu'il est transporté dans le noyau (Cupers *et al.* 2001 ; Cao & Sudhof 2001 ; Gao & Pimplikar 2001).



**Figure 9 : Représentation schématique comparative des protéines APP et APPL.** Les domaine E1, E2, Ac et YENPTY sont conservés entre les mammifères et la drosophile. Seule la région du domaine A $\beta$  ne présente pas de conservation de séquence, bien que la région semble conserver sa fonction toxique. (Figure issue de Müller & Zheng 2012).

Les fragments sécrétés sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$  pourraient eux aussi avoir un effet sur le développement. Ces fragments présentent des affinités avec différents récepteurs, tels que les récepteurs de facteurs de croissance (GFR) (Wallace *et al.* 1997 ; Akar & Wallace 1998), et permettraient de potentialiser l'activation des voies de signalisation liées à la croissance cellulaire.

## **2.2 Rôle de la protéine APPL chez la drosophile**

Afin d'étudier le rôle physiologique d'APP, le modèle drosophile présente l'avantage de n'exprimer qu'une seule protéine homologue aux membres de la famille APP des vertébrés, évitant ainsi les effets de redondance génétique. Chez la drosophile, cette protéine est exprimée exclusivement dans le système nerveux (Luo *et al.* 1990 ; Martin-Morris & White 1990). Bien que cette protéine APP-like (APPL) ne présente qu'environ 30% d'identité globale avec son homologue humain, on peut observer une plus forte identité (environ 50%) des domaines extracellulaires E1 et E2, et de la région intracellulaire avec la protéine APP (Rosen *et al.*, 1989) (**Figure 9**). De plus, il a été démontré que les différentes sécrétases clivant APP sont conservées chez la drosophile, et permettent de fractionner la protéine APPL en différents fragments (Carmine-Simmen *et al.* 2009). Il a ainsi été mis en évidence la formation d'un fragment sécrété (sAPPL), d'un fragment intracellulaire (dAICD), mais aussi d'un fragment A $\beta$ -like (dA $\beta$ ) (Luo *et al.* 1990 ; Carmine-Simmen *et al.* 2009 ; Bolkan *et al.* 2012 ; Ramaker *et al.* 2016). Tout comme son homologue humain, le peptide dA $\beta$  possède un effet toxique et entraîne une neurodégénérescence chez la drosophile âgée (Carmine-Simmen *et al.* 2009). La région intracellulaire d'APPL présente une forte homologie avec celle d'APP humain. Nous retrouvons entre autres le motif YENPTY et le site de fixation à la protéine G<sub>0</sub>. Il a ainsi été



démontré que tout comme son homologue, APPL est capable de se lier grâce à ce site de fixation à la protéine  $G\alpha_0$  (mais pas aux protéines  $G_i$  et  $G_s$ ). L'activation de cette petite protéine G par APPL est impliquée dans la régulation de la migration neuronale (Ramaker *et al.* 2013).

L'ensemble de ces résultats souligne une conservation structurelle entre APPL et son homologue humain APP, mais aussi une conservation de la fonction toxique du peptide issu de la fragmentation de la protéine. Cela nous laisse suggérer qu'APPL et APP possède aussi des fonctions physiologiques similaires, si ce n'est identiques. Ainsi, l'étude du rôle physiologique d'APPL chez la drosophile serait susceptible d'aider à la compréhension de la fonction d'APP chez l'homme.

### **2.2.1 Rôle d'APPL dans le développement du système nerveux**

Les drosophiles mutantes pour *App1* (*App1<sup>d</sup>*) sont viables et fertiles (Luo *et al.* 1992). Cependant, les mutants pour ce gène présentent quelques défauts au niveau du développement du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP).

Au niveau du SNP, le mutant *App1<sup>d</sup>* présente une perte des soies sensorielles (MSO : Mechano Sensory Organs) au niveau du scutellum (Merdes *et al.* 2004), pouvant être partiellement restaurée par l'expression d'*App1* dans ce contexte. De plus, ce phénotype mutant a été reproduit en exprimant une construction d'interférence à l'ARN (ARNi) durant le développement. Cette étude suggère un rôle d'APPL dans la formation des précurseurs cellulaires des récepteurs sensoriels, à l'origine du développement des MSO.

En parallèle, une étude en culture cellulaire a montré que la perte et le gain de fonction d'*App1* entraînaient une diminution de la croissance neuronale (Li *et al.* 2004). Il a pu être mis en évidence que la protéine APPL non sécrétée (APPL<sup>sd</sup>) avait la capacité de favoriser la





croissance axonale, alors qu'à l'inverse la forme sécrétée d'APPL induisait une diminution de la croissance. Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse qu'APPL, en tant que récepteur, favoriserait la croissance axonale.

Ce rôle d'APPL dans la croissance axonale a été par la suite confirmé dans le SNC. Soldano *et al.* (2013) ont démontré que le mutant *Appl<sup>d</sup>* entraînait des défauts dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. En effet, *Appl* est nécessaire de façon autonome cellulaire à la croissance des axones  $\beta$ , bien que le phénotype n'ait une pénétrance que de 14%. De façon très intéressante, ils ont aussi pu démontrer qu'à l'inverse, APPL agirait sur le développement du lobe  $\alpha$  de façon non autonome cellulaire. Grâce aux expériences de sauvetage, ils ont pu mettre en évidence le rôle de la partie intracellulaire d'APPL dans le recrutement de la tyrosine kinase ABL via l'intermédiaire de DAB. L'ensemble de ces résultats a permis de présenter APPL comme un co-récepteur de la voie PCP (Planar Cell Polarity) pendant la croissance des axones  $\beta$  des neurones  $\alpha/\beta$  des MB (Ces résultats seront détaillés ultérieurement).

La surexpression d'APPL, mais aussi d'APP, entraîne une augmentation de l'arborisation axonale (Leyssen *et al.* 2005). Tout comme pour la croissance axonale des neurones  $\alpha/\beta$ , cet effet passe par une interaction avec la protéine ABL via le domaine intracellulaire d'APPL.

Enfin, alors que l'expression d'*Appl* avait été observée dans les photorécepteurs et les axones en cours de développement (Torroja *et al.* 1996), Mora *et al.* (2013) ont pu démontrer que l'expression d'*Appl* est plus importante dans les photorécepteurs R7 et R8. Ces derniers projettent leur axone dans le second neuropile optique (medulla) où ils connectent dans différentes couches cellulaires (Meinertzhagen & Hanson 1993). Ils ont aussi montré que chez un mutant *Appl<sup>d</sup>*, un faible pourcentage des axones du photorécepteur R7 ne ciblent pas les



bonnes couches de la medulla. Bien que ce phénotype soit relativement faible, il induit une forte diminution de la réponse aux UVs chez la drosophile adulte. Le phénotype du mutant *Appl<sup>d</sup>* a pu être augmenté en associant la mutation à des mutants hétérozygotes de différents récepteurs membranaires, ce qui laisse penser qu'*Appl* agirait comme un co-récepteur pour permettre le guidage des axones R7 vers leur cible.

Ces différentes études ont montré le rôle d'APPL, principalement sous forme de récepteur, dans la croissance du système nerveux. Cependant, il est à noter que la pénétrance du phénotype mutant d'*Appl<sup>d</sup>* reste faible, ce qui laisse penser que la protéine jouerait plutôt un rôle de soutien dans le développement.

### **2.2.2 Rôle d'APPL dans la synaptogénèse et le transport axonal**

En parallèle de son rôle dans le développement, différentes études ont montré qu'*Appl* joue un rôle dans le transport axonal et la formation de la synapse.

Il a été montré que la perte et le gain de fonction d'*Appl* induisent la formation d'agrégats neuronaux provoquant des défauts dans le transport axonal (Gunawardena & Goldstein 2001). De plus, l'action d'*Appl* dans le transport axonal requiert la partie intracellulaire de la protéine via son interaction avec la kinésine 1.

Une étude plus récente a mis en évidence une régulation dynamique du transport d'APPL le long des axones, permettant à la protéine de se retrouver rapidement au niveau du cône de croissance ou du bouton synaptique pendant le développement (Ramaker *et al.* 2016). Une fois insérée à la membrane, il semblerait que la protéine subirait rapidement différents processus de clivage, ce qui explique le besoin d'un rapide renouvellement de la protéine entière.



L'étude du mutant *Appl<sup>d</sup>* dans les jonctions neuromusculaires pendant le développement larvaire a permis de démontrer un rôle d'*Appl* dans la formation des boutons synaptiques (Torroja et al 1999b). Alors que la surexpression d'APPL dans les motoneurones augmente le nombre de boutons synaptiques, le mutant *Appl<sup>d</sup>* produit l'effet inverse. Une construction exprimant une forme d'APPL délétée de son domaine intracellulaire a permis de mettre en évidence que le domaine cytoplasmique, et plus précisément le motif YENPTY et le domaine G<sub>0</sub>, participent à la formation des boutons synaptiques. Ces résultats permettent à nouveau de proposer APPL comme étant un récepteur.

L'étude du rôle d'*Appl* dans le développement synaptique des jonctions neuromusculaires a également mis en évidence une interaction biochimique entre APPL et FASII, une protéine membranaire d'adhésion cellulaire (Ashley *et al.* 2005). Cette étude a mis en avant la capacité de FASII à induire la formation de nouvelles synapses grâce à l'activation d'une voie de transduction, impliquant dX11/Mint, sous le contrôle d'APPL.

### **2.2.3 Rôle d'APPL dans la survie neuronale**

Outre son rôle pendant le développement, il semblerait qu'APPL agisse aussi en réponse à une blessure. En effet, après avoir subi un traumatisme physique, les cerveaux de drosophiles présentent une augmentation importante de la quantité d'APPL dans les zones ayant subi les dommages (Leyssen *et al.* 2005). Cette surexpression d'APPL est corrélée à celle de la voie de signalisation JNK, connue pour être impliquée dans le développement chez la drosophile (Martin-Blanco 1997 ; Galko & Krasnow *et al.* 2004) et dans la régénérescence axonale chez les mammifères (Raivich *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent une coopération entre APPL et la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase) suite à une blessure, afin d'assurer la survie



neuronale.

De par son homologie avec la protéine humaine APP, il était intéressant d'observer l'effet d'APPL chez des drosophiles âgées. Tout d'abord, il a été montré que les mutants *App<sup>Δ</sup>* ont une durée de vie réduite par rapport aux drosophiles sauvages (Wentzell *et al.* 2012), ce qui pourrait être corrélé avec l'apparition d'une dégénérescence neuronale liée à l'âge. De plus, le mutant *App<sup>Δ</sup>* permet d'amplifier l'effet neurodégénératif venant d'autres gènes mutés comme *yata* et *löchrig (loe)* (Sone *et al.* 2009 ; Tschäpe *et al.* 2002). A l'inverse, l'expression de la protéine entière APPL, ou de la forme sécrétée d'APPL permet d'empêcher la dégénérescence neuronale observée chez le mutant *loe*. Wentzell *et al.* (2012) ont pu mettre en évidence que cet effet neuroprotecteur d'APPL se faisait via son clivage par l'homologue drosophile de l' $\alpha$ -sécrétase (*kuz*). L'effet bénéfique de cette forme sécrétée d'APPL (APPL<sup>s</sup>) ne se produisant qu'en présence de la protéine entière démontre par ailleurs que cette forme d'APPL est capable de se lier avec la protéine entière. Le clivage d'APPL par l'homologue de la  $\beta$ -sécrétase (dBACE) produit, quant à lui, l'effet inverse en augmentant le phénotype du mutant *loe*. Ces résultats démontrent un effet antagoniste d'APPL sur la survie neuronale selon le type de sécrétase clivant la protéine, comme cela a déjà été démontré chez l'homme avec la protéine APP.

Ces résultats confirment ceux obtenus dans l'étude de Carmine-Simmen *et al.* de 2009, qui montrent que le clivage d'APPL en surexpression de la sécrétase dBACE entraîne une dégénérescence des photorécepteurs. Ce phénotype est retrouvé lorsque le peptide dA $\beta$  est exprimé dans les photorécepteurs.

L'ensemble de ces résultats montre une balance dans le clivage d'APPL par l' $\alpha$ -sécrétase et la  $\beta$ -sécrétase, dévoilant respectivement un effet neuroprotecteur ou un effet neurodégénératif de ces fragments (Ramaker *et al.* 2016 ; Wentzell *et al.* 2012 ; Carmine-





Simmen *et al.* 2009).

#### **2.2.4 Rôle d'APPL dans la mémoire**

Le fait qu'à l'âge adulte la protéine APPL soit principalement exprimée dans les MB, le centre de la mémoire et de l'apprentissage, pourrait suggérer un potentiel rôle d'APPL dans la mémoire chez la drosophile. Afin de répondre à cette question, Goguel *et al.* (2011) ont exprimé une construction ARNi contre *App1* dans les MB, uniquement chez des drosophiles adultes grâce au « système Switch ». Ce système permet d'activer les séquences UAS par la protéine GAL uniquement en présence d'un composé chimique : RU486. Ainsi, l'administration de ce composé aux mouches permettra l'expression du gène sous le contrôle de la séquence UAS. Grâce à ce système le développement de ces mouches n'est pas affecté. Ils ont ensuite mesuré les performances des différentes mémoires produites par les drosophiles : la mémoire à court terme (STM), la mémoire à long terme (LTM) et la mémoire résistance à l'anesthésie (ARM). La STM ne dure qu'environ une heure, l'ARM peut durer plusieurs heures, et la LTM dure 24H voire plus (Chabaud *et al.* 2009). L'analyse des STM et ARM ne montre aucune différence après l'expression de l'ARNi-*App1*, tandis que la LTM présente des performances diminuées. Il était déjà établi que la LTM reposait sur une synthèse protéique *de novo*, et le fait que la perte d'APPL puisse affecter cette mémoire laisse penser qu'APPL agirait sur la plasticité synaptique lors de la formation de la mémoire.

Plus récemment, la même équipe a démontré que les mutants *App1<sup>d</sup>* hétérozygotes développent des défauts de la STM et LTM, alors que ces individus n'ont pas de défaut de développement au niveau des MB (Bourdet *et al.* 2015a). L'apparition d'une diminution de la STM dans cette condition, alors qu'elle était normale après l'expression de l'ARNi-*App1*, est



due au fait que la quantité d'ARNm-*App1* en condition hétérozygote mutant est inférieure à celle suite à l'expression de l'ARNi-*App1*. Cela permet d'avancer l'hypothèse que plus la quantité d'APPL est faible, plus les défauts de mémoire sont importants. Il est montré dans cette étude que ce phénotype de la STM est sauvé par l'expression à l'âge adulte soit de la forme secrétée d'APPL (APPL<sup>s</sup>), soit de la forme non clivable d'APPL (APPL<sup>sd</sup>). A l'inverse, aucune de ces deux formes n'est capable de sauver le phénotype de LTM. Cela pourrait vouloir dire que pour chacun de ces deux types de mémoire, APPL agirait selon des mécanismes différents.

Enfin une troisième étude a démontré l'impact toxique du fragment A $\beta$  de drosophile sur la STM. Il a été montré que la surexpression chez l'adulte de la  $\beta$ -sécrétase (dBACE), ou du fragment dA $\beta$  dans les MB dans un contexte mutant hétérozygote *App1<sup>d</sup>* amplifiait significativement les défauts de la STM (Bourdet *et al.* 2015b).

Ces différentes études démontrent que, bien que le peptide dA $\beta$  ait un effet néfaste sur la mémoire, c'est la perte de la fonction physiologique d'APPL qui initie les problèmes au niveau de la formation de la mémoire. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle chez l'homme, les troubles de la mémoire observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ne sont peut-être pas seulement dus à l'agrégation du peptide A $\beta$ , mais aussi à la perte d'APPL et de sa fonction physiologique.

### **2.2.5 Rôle d'APPL dans le comportement**

Outre son effet dans la mémoire, le mutant *App1<sup>d</sup>* montre aussi des défauts comportementaux, et notamment dans le phénomène de phototaxie lié à une réactivité locomotrice réduite (Luo *et al.* 1992). Ce défaut peut être sauvé grâce à l'expression de la



protéine APPL entière. *A contrario*, l'expression d'une forme APPL<sup>sd</sup> ne permet pas de reproduire ce sauvetage, soulignant le fait que cet effet d'APPL passe par sa forme sécrétée.

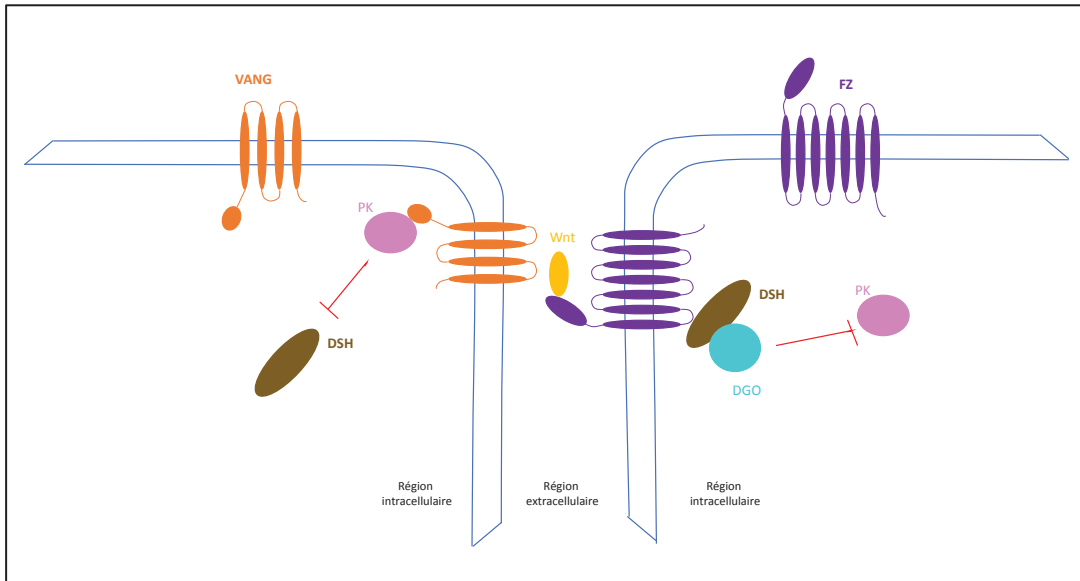
Un effet d'APPL a aussi été démontré dans la régulation du rythme circadien (Blake *et al.* 2015). La surexpression de la sécrétase dBACE dans les « clock cells » grâce à timeless-GAL4 entraîne d'une part une diminution de l'espérance de vie, et d'autre part dérégule le rythme activité/repos. Des résultats similaires sont observés lorsque cette fois-ci on surexprime *kuz*, suggérant que pour la régulation du rythme circadien, APPL possède un effet protecteur dans sa forme entière. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par Long *et al.* en 2014, où ils observaient une dérégulation du rythme circadien de la drosophile après l'expression des fragments A $\beta$  humain.

### **3. La voie PCP**

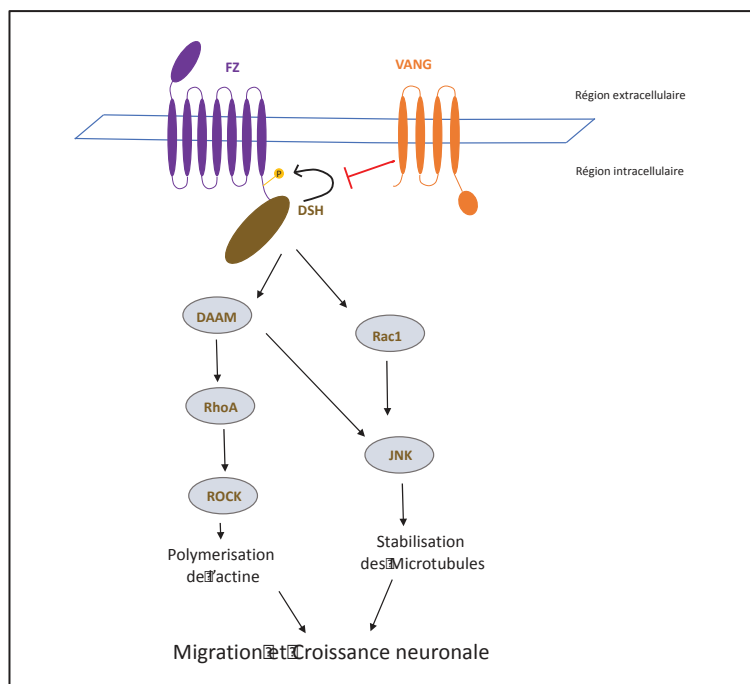
#### **3.1 Fonction**

La voie Planar Cell Polarity (PCP), voie non canonique des Wnt, représente une voie de régulation majeure dans le contrôle de la polarité cellulaire de l'épithélium. Elle a été découverte en 1982, suite à la réalisation d'un crible génétique chez la drosophile mettant en avant le rôle de deux gènes de la voie des Wnt : *fz* (*frizzled*) et *pk* (*prickle*) dans la régulation de la polarisation de la cuticule (Gubb & Garcia-Bellido 1982). Cette voie oriente les cellules le long d'un axe pendant le développement, permettant la formation de différents organes et tissus tels que l'œil, de la cuticule de l'aile et de l'abdomen chez la drosophile. La conservation de cette voie notamment chez les vertébrés a été démontrée.

Dans les cellules non polarisées, les différentes protéines de la voie sont réparties de façon homogène dans la cellule. Pendant le stade pupal, ces protéines vont être distribuées



**Figure 10 : La voie PCP dans les cellules épithéliales.** Dans des cellules épithéliales en cours de polarisation, l'expression de FZ et VANG se fait de façon asymétrique. Lorsque FZ reconnaît VANG sur la cellule voisine, il va induire un signal via de DSH afin d'inhiber PK, ce qui va permettre au final une accumulation de FZ dans cette région et devenir le pole distal de la cellule. A l'inverse, l'activation de VANG va induire une inhibition de DSH via PK, ce qui mènera à la formation de pole apical. (Schéma inspiré de l'article de McNeill & Woodgett 2010).



**Figure 11 : La voie PCP dans les cellules neuronales.** VANG et FZ co-localisent à la membrane. L'activation de FZ par son ligand WNT permet l'activation de DSH, permettant l'activation des petites protéines Rho et Rac, qui réguleront le cytosquelette cellulaire. (Schéma inspiré de l'article de Clark *et al.* 2012).

de façon asymétrique. Alors que FZ, DSH (*dishevelled*) et DGO (*diego*) seront localisées à la membrane distale, VANG (*Van Gogh*) et PK le seront à la membrane proximale (Axelrod 2001 ; Jenny et al. 2003). Seule exception, la protéine FMI (*flamingo*) est présente aux deux extrémités et favoriserait la communication cellulaire en participant à la formation des jonctions cellulaires. Enfin, le ligand Wnt semble être l'activateur de cette voie (**Figure 10**).

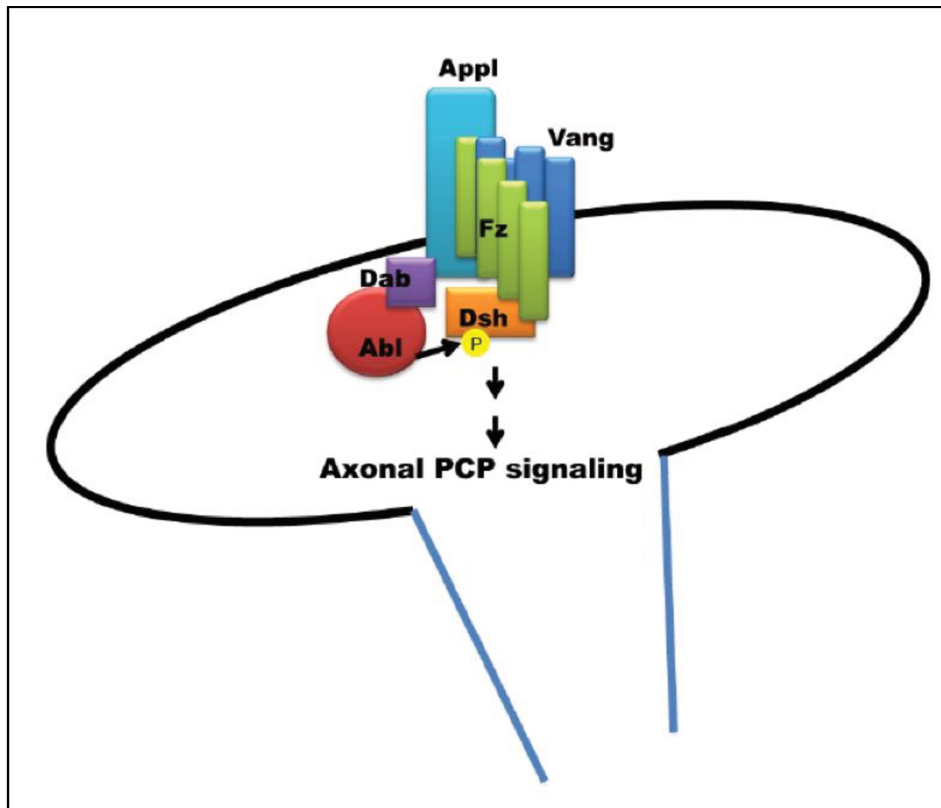
Outre son implication dans le développement épithéliale, la voie PCP intervient aussi dans différents processus du développement du système nerveux, tels que la croissance axonale, le guidage axonal et la synaptogénèse (Lee *et al.* 2003 ; Goodrich 2008 ; Wada & Okamoto 2009 ; Tissir & Goffinet 2010). Lors du développement neuronal, les récepteurs FZ et VANG sont co-localisés à la membrane du cône de croissance (**Figure 11**).

### **3.2 Les membres de la voie PCP dans les neurones $\alpha/\beta$ de drosophile**

Une étude menée par l'équipe de Bassem Hassan, en collaboration avec la nôtre, a démontré récemment que la voie PCP est impliquée dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB de drosophile (Soldano *et al.* 2013). Dans ce système, les protéines FZ et VANG sont avec APPL des co-récepteurs, permettant la phosphorylation et activation de DSH, via la protéine ABL (Abelson Tyrosine Kinase) (**Figure 12**).

#### **3.2.1 Les récepteurs : *Appl*, *fz* et *Vang***

Dans cette étude, APPL est décrit comme un co-récepteur de FZ et VANG. En effet le phénotype mutant *Appl<sup>d</sup>* est amplifié par la perte de fonction partielle de *fz* ou de *Vang*. Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, ils ont pu mettre en évidence une interaction physique entre APPL et FZ et entre APPL et VANG, conservées entre les protéines de



**Figure 12 :** La voie PCP impliquée dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Ce modèle présente APPL comme un modulateur positif de l'activation de la voie PCP. APPL permet le recrutement et l'activation de la protéine ABL, qui phosphorylera DSH. L'activation de cette voie est requise pour la croissance des axones  $\beta$  des MB. (Schéma issu de l'article de Soldano *et al.* 2013).



mammifères.

Le fait que l'activation de la voie PCP soit sous le contrôle de ces trois récepteurs laisse supposer qu'il y a un effet compensatoire des autres récepteurs lorsque l'un d'entre eux est muté. Cela peut aussi expliquer que le phénotype mutant *Appl<sup>d</sup>* ait une faible pénétrance (environ 15% d'absence du lobe  $\beta$ ).

De plus, les données génétiques et biochimiques tendent à montrer que la protéine WNT5 pourrait être le ligand commun aux trois récepteurs.

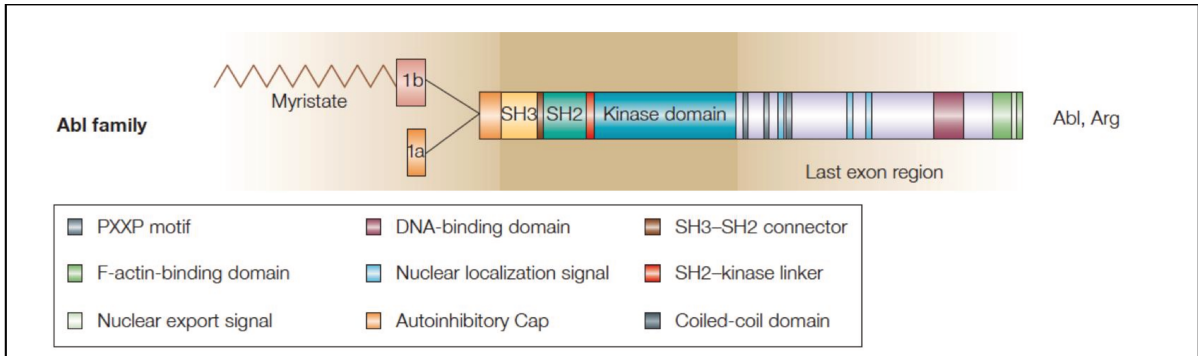
### **3.2.2 Le gène *dsh***

Dans la voie PCP, la protéine cytoplasmique DSH est sous le contrôle du récepteur FZ. Le gène *dsh* est fortement conservé entre les espèces. La protéine est composée de trois domaines : domaine DIX, le domaine PDZ, et le domaine DEP en région C-terminale. Ces différents domaines sont tous impliqués dans des interactions protéiques. La régulation de l'activité et la localisation de DSH sont des marqueurs de l'activité de voies de signalisation.

L'activité de DSH est dépendante de ses domaines PDZ et DEP. Le recrutement de DSH par FZ se traduit par une hyper-phosphorylation de la protéine.

Dans le cas de neurones  $\alpha/\beta$  des MB, il a été montré que le mutant *dsh<sup>1</sup>*, n'affectant que la fonction de *dsh* dans la voie PCP, présente des défauts de développement des lobes  $\alpha$  et  $\beta$ , identiques à ceux du mutant *Appl<sup>d</sup>*. Le sauvetage du mutant *Appl<sup>d</sup>* par la surexpression de *dsh* a permis de confirmer le rôle d'APPL dans cette voie.

Cette étude de Soldano *et al.* 2013 fait suite à celle de Singh *et al.* 2010, qui définit la protéine ABL comme étant la kinase phosphorylant DSH pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$ .



**Figure 13 : Représentation schématique des protéines de la famille ABL chez les mammifères.** L'épissage alternatif d'*Abl* produit deux isoformes : 1a et 1b. Seule l'isoforme 1b sera myristoylée en partie N-terminale. Abl: Abelson tyrosine kinase, Arg: Abl-related gene. (Schéma issu de l'article de Hantschel & Superti-Furga 2004).

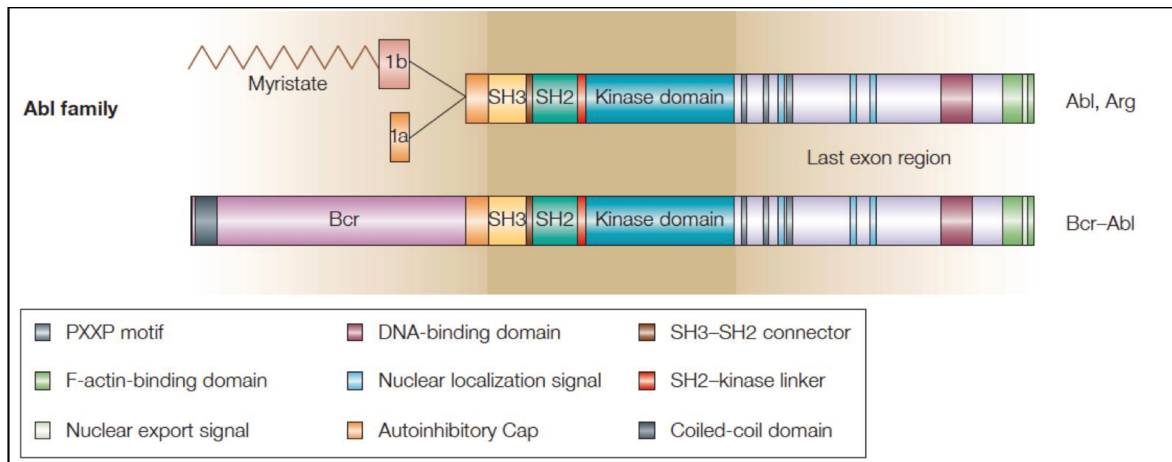
### 3.2.3 Le gène *Abl*

Le gène *Abl* code pour une tyrosine kinase cytoplasmique, hautement conservée au cours de l'évolution. Alors que chez les mammifères les tyrosines kinase de la famille Abl incluent deux protéines : c-Abl (ou Abl1) et ARG (ou Abl2), la drosophile n'en possède qu'une seule : ABL.

La protéine est composée en N-terminal des domaines SH3, SH2 et kinase, alors qu'en C-terminal se trouve entre autres un site de fixation à l'ADN, un site de fixation à l'actine et un motif PXXP pouvant se lier aux protéines CRK et ABI (**Figure 13**).

La fonction d'ABL est corrélée à sa localisation dans la cellule. Alors qu'une localisation cytoplasmique d'ABL semble nécessaire pendant le développement, la protéine est présente au niveau nucléaire en cas de réponse au stress (Van Etten *et al.* 1989).

Enfin, l'activité kinase d'ABL dépend de son état de phosphorylation au niveau de la tyrosine 412 (Dorey *et al.* 2001). La protéine ABL alterne entre un état actif et un état inhibé, soit grâce à un inhibiteur, soit par auto-inhibition. L'auto-inhibition d'ABL repose sur des interactions intramoléculaires complexes, entre le domaine SH3 et la région « linker » connectant les domaines SH2 et kinase (Barilà *et al.* 1998 ; Pluk *et al.* 2002). En parallèle, différentes études ont démontré une régulation de l'activité d'ABL grâce à des inhibiteurs. Par exemple lorsque l'actine se fixe à son site de fixation sur ABL, elle permet de réguler négativement sa fonction kinase (Woodring *et al.* 2001), probablement en favorisant une conformation inhibée de la protéine.



**Figure 14 : Représentation schématique de la protéine fusion BCR-ABL chez les mammifères.** Abl: Abelson tyrosine kinase, Arg: Abl-related gene, BCR: Breakpoint cluster region. (Schéma issu de l'article de Hantschel & Superti-Furga 2004).

### **3.2.3.1 Rôle oncogénique d'Ab1 chez l'homme**

Chez l'homme, ABL a été identifié comme étant responsable de deux types de leucémies : la leucémie myéloïde chronique (LMC) et la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL). Ces cancers se développent suite à une translocation d'Ab1 du chromosome 9 sur BCR (Breakpoint Cluster Region) sur le chromosome 22, générant une protéine fusion BCR-ABL dont l'activité kinase est constitutive. A ce jour la fonction endogène de la protéine BCR est encore très incertaine. Différentes protéines BCR-ABL ont été détectées, chacune différant dans la longueur de la séquence BCR fusionnée. Alors que la protéine P210 BCR-ABL est caractéristique de la LMC, la protéine P185 BCR-ABL est caractéristique de la LAL (**Figure 14**).

La fusion d'une partie de la protéine BCR à la protéine ABL empêche l'auto-inhibition naturelle de cette dernière. Au fil des années, différents traitements thérapeutiques ont été développés, permettant de réguler négativement l'activité d'ABL. Alors que les inhibiteurs de type 1 vont cibler et inhiber les conformations actives de l'activité kinase, les inhibiteurs de type 2 vont stabiliser et empêcher l'activation des protéines en conformations inactives.

Cependant, bien que le rôle de BCR-ABL dans les leucémies soit bien détaillé, peu de d'informations sont disponibles sur le rôle d'ABL dans d'autres tumeurs. Différents travaux ont démontré une surexpression d'ABL dans des cancers du sein, des ovaires, de la langue, de la peau... (Srinivasan & Plattner 2006 ; Lin *et al.* 2007 ; Drake *et al.* 2012). Des mutations somatiques d'ABL ont aussi été détectées dans ces différents cancers, bien que leurs rôles dans la régulation de l'activité d'ABL n'aient pas encore été déterminés.

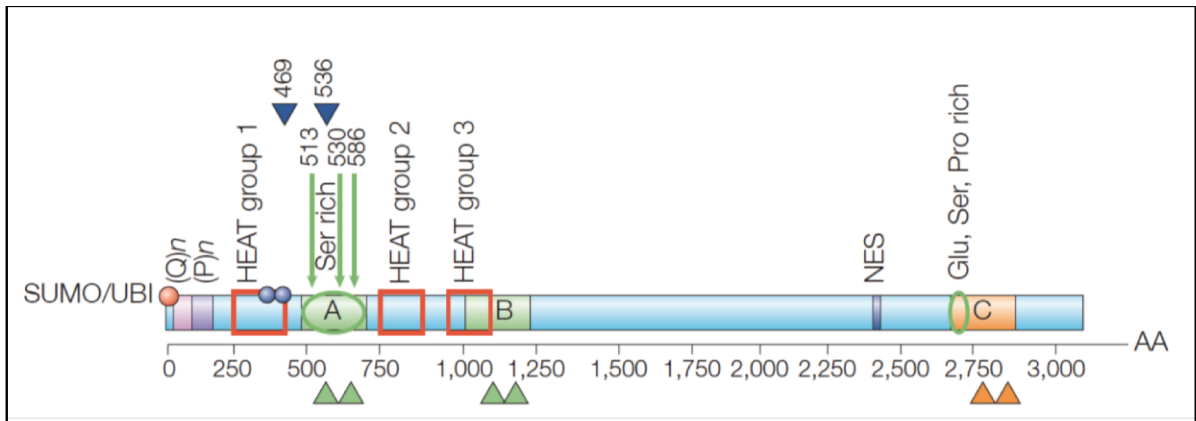


### **3.2.3.2 Rôle d'AbI pendant le développement**

En plus de son rôle évident dans le développement tumoral chez l'homme, différents travaux ont démontré l'importance d'AbI pendant le développement neuronal chez l'embryon. Chez les mammifères, une perte de fonction de c-AbI provoque des défauts majeurs pendant le développement embryonnaire, entraînant une mortalité embryonnaire ou néonatale (Tybulewicz *et al.* 1991 ; Schwartzberg *et al.* 1991 ; Koleske *et al.* 1998). Dans les embryons de souris et de drosophile, ABL est exprimée dans le système nerveux au niveau des cônes de croissance et des synapses (Koleske *et al.* 1998 ; Gertler *et al.* 1989), laissant supposer que cette protéine a un rôle dans le développement du système nerveux. Alors que chez la souris l'étude de Koleske *et al.* (1998) montre que les mutants AbI présentent un retard dans la fermeture du tube neural, chez la drosophile différentes études démontrent le rôle d'AbI dans le guidage axonal (Wills *et al.* 1999 ; Grevengoed *et al.* 2001). Grâce à la drosophile, il a pu être mis en avant que différents gènes interagissant génétiquement avec AbI régulent la structure et la fonction de l'actine (*arm* et *trio*, Loureiro & Peifer 1998 ; Liebl *et al.* 2000), ou la différenciation et développement neuronal (*dab*, *pros*, *Notch* et *dsh*, Gertler *et al.* 1993 ; Giniger 1998 ; Singh *et al.* 2010).

### **3.2.3.3 Fonction d'AbI dans les maladies neurodégénératives**

Bien que la fonction d'AbI soit importante pendant le développement, peu de données sont connues sur l'effet d'AbI dans le système nerveux adulte. Cependant, il a été montré qu'une forte activité d'ABL était observée dans des cerveaux humains atteints d'une maladie neurodégénérative et notamment la maladie d'Alzheimer. La présence d'ABL phosphorylée au niveau de la tyrosine 412 a été retrouvée dans les zones dégénérées d'un cerveau souffrant



**Figure 15 :** Représentation schématique de la protéine HTT chez les mammifères. (Q)<sub>n</sub> : séquence polyglutamine, (P)<sub>n</sub> : séquence polyproline, HEAT (rectangle rouge) : cluster de séquences répétées, NES : nuclear export signal. Le petit cercle rouge correspond aux sites de modifications post-traductionnel de Sumoylation et Ubiquitination. Les petits cercles bleus correspondent aux sites de phosphorylation des sérines 421 et 434. Les grands cercles verts correspondent aux régions riches en acide glutamique, sérine et proline. Les flèches vertes indiquent les sites de clivage par les caspases (513, 530, 586). Les têtes de flèches bleues indiquent les sites de clivage par la calpaïne (469, 536). Les têtes de flèches vertes et oranges indiquent les sites de clivage par différentes protéases. (Schéma issu de l'article Cattaneo *et al.* 2005).



de cette pathologie (Jing *et al.* 2009). Des expériences de cellules en culture ont montré que le stress oxydatif et les plaques amyloïdes induisent l'activation d'*Abl* (Alvarez *et al.* 2004). Enfin, l'expression d'une forme constitutivement active d'ABL dans des neurones de souris entraîne une sévère neuro-inflammation (Schlatterer *et al.* 2011). Ces résultats laissent supposer qu'*Abl* pourrait jouer un rôle dans le développement de cette pathologie.

#### **4. Le gène *htt***

##### **4.1 Rôle de son homologue HTT chez l'homme**

Depuis sa découverte en 1993, la protéine HTT (Huntingtine) a été intensément étudiée du fait de son implication dans la maladie de Huntington (MH). Une mutation autosomale dominante dans le gène codant la protéine entraîne la formation d'une séquence polyglutamine (polyQ). La longueur de cette séquence polyQ est corrélée à la gravité des symptômes de cette pathologie. Cependant, de nombreuses études avancent l'hypothèse qu'outre l'apparition d'un gain de fonction de cette séquence polyQ, la perte de fonction d'HTT sauvage pourrait aussi être un facteur aggravant de la maladie.

##### **4.1.1 Structure de la protéine HTT**

Le gène *htt* code pour une protéine soluble composée de 3 144 acides aminés (350kDa) (**Figure 15**). Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme (Sharp *et al.* 1995), bien que son expression soit plus forte dans le CNS que dans les autres tissus.

Au niveau N-terminal de la protéine, on découvre la région polyQ pouvant déclencher la MH. Cette région est considérée comme sauvage lorsque la quantité de glutamine ne



dépasse pas 35 résidus. Au-delà, la protéine acquiert ses propriétés toxiques. Dans des conditions physiologiques, cette région polyQ aurait une fonction neuronale. En effet, l'expression d'une protéine HTT dépourvue du domaine polyQ chez la souris entraîne des défauts comportementaux à l'âge adulte (Clabough & Zeitlin 2006). Il semblerait que les 17 acides aminés précédant la région polyQ participent aussi à l'agrégation de la protéine lorsqu'elle est mutée (Thakur *et al.* 2009).

La région polyQ est suivie par un domaine riche en proline (PRR). Ce domaine n'est retrouvé que chez les mammifères. Ce domaine aiderait à maintenir la protéine dans un état soluble, en limitant le phénomène d'agrégation de la protéine mutante (Bhattacharyya *et al.* 2006 ; Ignatova & Gierash 2006). Enfin, ce domaine participerait à l'interaction avec différents interacteurs d'HTT (Gao *et al.* 2006).

De plus, la présence de séquences de localisation et d'exportation nucléaires (NLS et NES) suggère l'existence d'un trafic d'HTT entre le noyau et le cytoplasme (Xia *et al.* 2003 ; Cornett *et al.* 2005).

Enfin, on retrouve sur tout le long de la protéine des répétitions de séquence HEAT (Huntingtine, facteur d'Elongation, protéine phosphatase 2A et IOR1) (Tartari *et al.* 2008 ; Zhang *et al.* 2009). Ces séquences, composées d'environ 40 acides aminés, forment des domaines en hélice  $\alpha$ , qui s'assemblent en structure tertiaire entre eux afin d'assurer des interactions protéiques (Takano & Gusella 2002 ; Palidwor *et al.* 2009). Chez l'homme, il existe seize répétitions HEAT, réparties en quatre clusters le long de la protéine, alors que la drosophile possède seulement quatorze répétitions.

La protéine HTT présente aussi de nombreux sites de clivage, permettant la production de différents fragments, aussi bien sous sa forme mutée que sauvage (Goldberg *et al.* 1996 ; Wellington *et al.* 1998 ; Galfni *et al.* 2004). Ces sites de clivages se situent dans des domaines



PEST (domaines riches en Proline, Acide Glutamique, Sérine et Thréonine), répartis entre les répétitions HEAT.

Pour finir, il faut aussi noter que la protéine HTT subit de nombreuses modifications post-traductionnelles :

-La phosphorylation de certaines sérines aura pour effet de moduler l'activité d'HTT dans le transport axonal, ou encore de diminuer son clivage, réduisant en conséquence l'effet toxique du fragment polyQ libéré dans la MH (Luo *et al.* 2005 ; Colin *et al.* 2008).

-La sumoylation des lysines K9, K15 et K91 en région N-terminale augmenterait la toxicité du fragment polyQ mutant (Steffan *et al.* 2004).

-L'ubiquitination va permettre la dégradation de la protéine par le protéasome (Kalchman *et al.* 1996). Il semblerait qu'il y ait compétition avec la sumoylation sur les mêmes lysines en partie N-terminale, empêchant ainsi la dégradation de la protéine.

-L'acétylation participe activement à l'élimination par autophagie de la protéine mutante lors de la MH (Jeong *et al.* 2009).

-La palmitoylation d'HTT facilite l'adressage et l'ancrage d'HTT à la membrane plasmique (Huang *et al.* 2004).

#### **4.1.2 La Maladie d'Huntington**

Les patients atteints de la MH présentent une répétition anormalement longue du codon CAG au niveau du premier exon du gène codant la Huntingtine, se traduisant par une grande séquence polyQ dans la région N-terminale de la protéine. A partir de trente-six répétitions de glutamine, la protéine est considérée comme mutante. Le nombre croissant de glutamine sera corrélé à la sévérité et précocité des symptômes. Cette mutation autosomale



dominante se transmet de façon héréditaire, une seule copie du gène muté suffisant à induire la pathologie.

Le clivage de la protéine mutée entraîne une accumulation et une agrégation toxique du fragment polyQ dans le cytoplasme des neurones. Ces agrégats altèrent les fonctions cellulaires et induisent une dégénérescence neuronale, notamment au niveau du striatum (région essentielle du système locomoteur). Cette dégénérescence neuronale se traduit phénotypiquement par des mouvements arythmiques et involontaires, ainsi que des symptômes cognitifs et psychiatriques.

Différentes études ont permis de mettre en évidence que le développement de cette pathologie résulte à la fois d'un gain de fonction de ce fragment polyQ dans les neurones, mais aussi de la perte de fonction de la protéine endogène, séquestrée par les agrégats. Il a été notamment montré que l'expression de fragment sauvage de la partie N-terminale permet de compenser la toxicité des formes polyQ (Mugat *et al.* 2008 ; Arribat *et al.* 2013)

### **4.1.3 Rôle physiologique**

#### **4.1.3.1 Fonction dans le développement**

Chez la souris, une perte de fonction totale d'*htt* conduit à une létalité embryonnaire (Nasir *et al.* 1995 ; Duyao *et al.* 1995 ; Zeitlin *et al.* 1995). Toutefois, il semblerait que la présence d'un domaine polyQ mutant n'altère pas la fonction physiologique d'HTT pendant le développement (Wexler *et al.* 1987 ; Myers *et al.* 1989). Afin d'observer l'effet de la perte de fonction d'*htt* sur des stades développementaux plus avancés, il a été mis au point des souris Cre/Lox permettant l'inactivation d'*htt* plus tardivement dans le système nerveux (Dragatsis *et al.* 2000). Cela a permis de démontrer le rôle majeur que joue HTT dans le développement





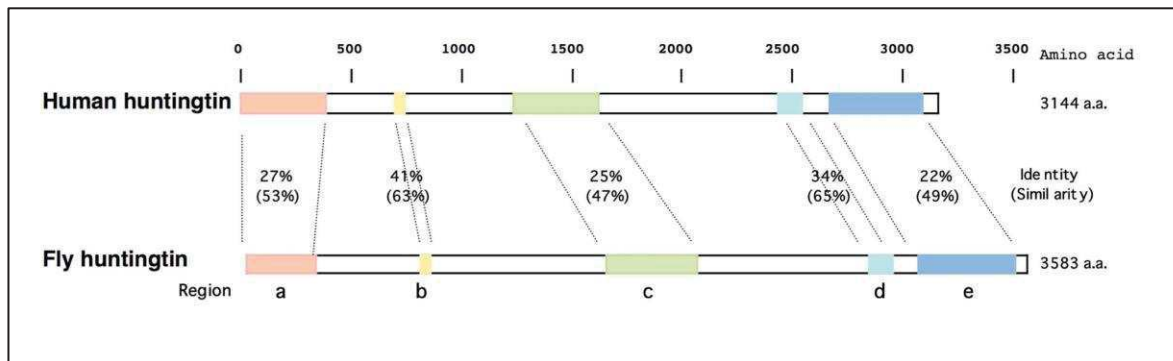
et la fonction du SNC. La perte d'HTT entraîne une forte dégénération neuronale et une mortalité précoce.

#### **4.1.3.2 Effet anti-apoptotique d'HTT**

Malgré son rôle toxique évident lorsqu'elle est mutée, différentes études ont démontré que la protéine HTT sauvage peut avoir un effet anti-apoptotique et neuroprotecteur (Rigamonti *et al.* 2001 ; Leavitt *et al.* 2006). La protéine HTT permet de réguler négativement la voie apoptotique en empêchant l'activation des caspases 9 et 3 (Rigamonti *et al.* 2001 ; Zhang *et al.* 2006). Il a aussi été montré qu'HTT a la capacité de se lier et d'inhiber les protéines Pak2 (p21 activated kinase2) et HIP1 (Huntingtin-Interacting protein 1), toutes deux médiatrices de la mort cellulaire, empêchant ainsi ces dernières d'assurer leur fonction apoptotique (Gervais *et al.* 2002 ; Luo & Rubinsztein 2009). Cette fonction anti-apoptotique d'HTT serait fortement réduite en condition mutant, à cause du domaine polyQ qui réduirait considérablement la capacité d'interaction d'HTT avec les différents membres de la voie de l'apoptose.

#### **4.1.3.3 Régulation de la transcription**

La présence d'HTT dans le noyau pouvait laisser supposer un rôle de la protéine dans la régulation de la transcription. Il a ainsi été montré que la protéine HTT sauvage est capable de lier une multitude de facteur de transcription, tel que CBP (cAMP response element Binding Protein) et p53 (Steffan *et al.* 2000). Grâce à ces interactions, HTT pourrait être en capacité de moduler différents phénomènes comme la régulation du cycle cellulaire, la survie neuronale.... Cependant, les mécanismes d'action d'HTT sur la transcription sont encore



**Figure 16 : Représentation schématique comparative de la protéine HTT entre la drosophile et les mammifères.** Les régions en couleur sont celles avec le plus fort taux d'identité entre les deux protéines. (Schéma issu de l'article Zhang *et al.* 2009).

méconnus. Des hypothèses ont été avancées proposant HTT comme étant à la base d'un complexe en se liant à l'ADN et permettant l'activation de la machinerie de transcription, ou encore en étant lui-même un cofacteur transcriptionnel (Dunah *et al.* 2002 ; Benn *et al.* 2008).

#### **4.1.3.4 Interaction sur le cytosquelette : impact sur le trafic vésiculaire**

Différentes études ont mis en avant l'interaction d'HTT avec les différentes protéines motrices le long des microtubules, via la protéine HAP1 (Huntingtin Associated Protein1) (Li *et al.* 1998 ; Gauthier *et al.* 2004 ; McGuire *et al.* 2006 ; Caviston *et al.* 2007). Ces interactions suggèrent un rôle de la protéine dans le transport antéro et rétrograde de ses différents partenaires. L'étude de Colin *et al.* 2008 démontre que l'état de phosphorylation d'HTT sur la sérine 421 permet de favoriser le transport antérograde en permettant un recrutement important des kinésines le long des microtubules.

## **4.2 Fonctions connues d'*htt* chez la drosophile**

La majorité des études faites chez la drosophile utilisent ce modèle pour exprimer les formes humaines d'HTT, à l'état sauvage ou mutant polyQ. Seulement très peu de travaux se sont intéressés à la protéine HTT endogène.

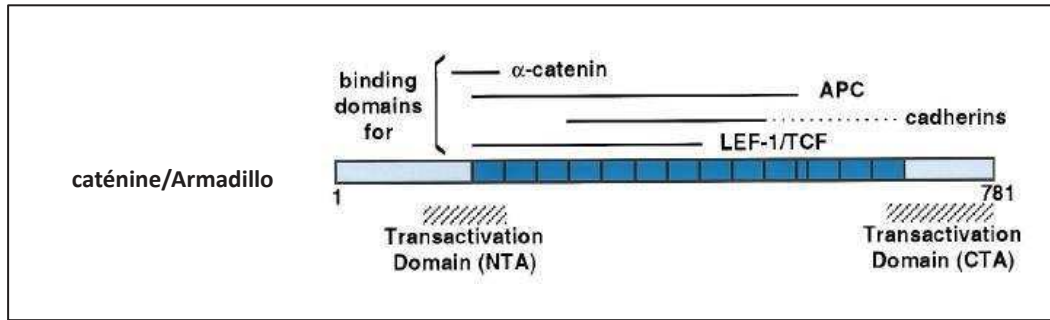
Suite à la découverte d'un gène homologue à HTT chez la drosophile, il a été démontré que la protéine de drosophile ne présente pas de domaine polyQ en région N-terminale, ni de région riche en proline (Li *et al.* 1999). On distingue cependant cinq régions particulièrement conservées (soit un tiers de la protéine) (**Figure 16**). La protéine est exprimée à tous les stades développementaux de façon ubiquitaire, comme son homologue humain.



Rapidement, l'expression d'un ARNi contre *htt* a permis de démontrer son implication dans le transport axonal (Gunawardena *et al.* 2003). La réduction partielle d'*htt* grâce au ARNi induit l'accumulation d'organelles dans les neurones chez la larve. Cette étude démontre aussi un effet dégénératif de la perte partielle d'*htt* chez la drosophile adulte.

Afin d'améliorer l'étude de la perte de fonction d'*htt* chez la drosophile, l'équipe de N. Perrimon a créé un mutant pour le gène *htt* (Zhang *et al.* 2009). Ils ont ainsi excisé 27 des 29 exons que composent ce gène, ainsi que le gène en amont. Cette lignée présentait une létalité à l'état homozygote, qui aurait pu coïncider avec les résultats obtenus en souris, cependant, l'expression du gène en amont, *CG9990*, grâce à une construction génomique a permis de sauver cette létalité. Il faut toutefois noter que cette construction exprime le gène *CG9990* mais aussi les premiers nucléotides du gène *htt* permettant l'expression des 90 premiers acides aminés de la protéine. Ce mutant viable noté *dhtt-ko* ne présente aucun défaut lors du développement, mais entraîne une diminution de la locomotion et de la viabilité chez les drosophiles âgées. L'étude de ce mutant a démontré que la perte d'*htt* n'avait d'impact ni sur la formation synaptique, ni sur le transport axonal, contrairement à ce que l'étude de Gunawardena *et al.* présentait. Cette absence notable de phénotype pourrait être due à l'expression de ce petit fragment d'*htt*.

Suite à ces deux études contradictoires sur le rôle d'*htt* dans le transport axonal, une étude en cellules de mammifères a démontré que les 620 premiers acides aminés de la protéine de drosophile sont capables d'assurer le transport de différents cargos, tels que les vésicules de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), en l'absence de la protéine HTT de mammifère (Zala *et al.* 2013). Cela démontre une conservation fonctionnelle des protéines humaine et de drosophile.



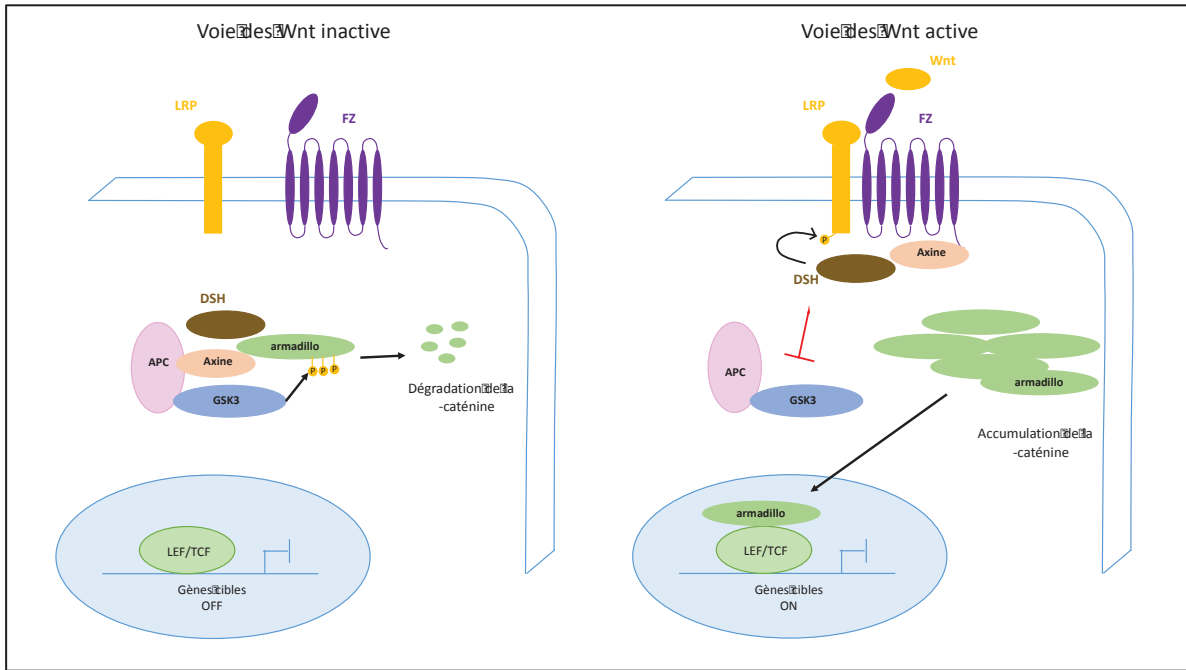
**Figure 17 : Représentation schématique de la protéine ARM.** Localisation des sites de fixation de l' $\alpha$ -caténine, APC, la cadhérine et le facteur de transcription LEF-1/TCF le long de la protéine ARM. (Schéma issu de l'article de Vleminckx *et al.* 1999).

Pour finir, un nouveau mutant nul pour *htt* a été récemment créé par l'équipe de J. Walker, leur permettant de démontrer qu'*htt* influence l'organisation de la chromatine, en favorisant la formation de l'hétérochromatine (Dietz *et al.* 2015). Cette étude démontre l'effet d'HTT, en coopération avec Lsd1, sur la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 permettant de contrôler l'expression de gènes essentiels lors de l'ovogénèse.

## 5. Le gène *arm*

La protéine ARM (*armadillo*) de la drosophile est l'homologue de la  $\beta$ -caténine chez l'homme. On retrouve cette protéine majoritairement dans les tissus épithéliaux mais aussi au niveau du SNC. Chez la drosophile, les mutants *arm* sont létaux dès le stade embryonnaire, démontrant l'importance de cette protéine durant le développement.

Cette protéine ARM est connue pour avoir un double rôle dans les tissus où elle est exprimée : elle est d'une part un membre de la voie de signalisation Wnt/Wingless, et d'autre part impliquée dans les interactions cellulaires via les jonctions adhérentes. C'est probablement grâce à sa composition structurelle qu'ARM est capable d'assurer ces deux fonctions différentes. Chez la drosophile, la région centrale d'ARM est constituée de 13 répétitions de 42 acides aminés (il n'y a que 12 répétitions dans la protéine humaine), précédées et suivies, respectivement, d'une grande région N-terminale et C-terminale (riche en glycine et proline) (Orsulic & Peifer 1996) (**Figure 17**). Des études de biochimie et de cristallographie montrent que l'interaction de certaines molécules ou protéines avec ARM empêche d'autres interactions. Ainsi, l'interaction avec la cadhérine dans les jonctions adhérentes prévient celle avec le complexe APC de la voie des Wnt. De ce fait, différentes études ont pu démontrer que les deux fonctions d'ARM sont indépendantes l'une de l'autre,



**Figure 18 :** Représentation schématique de voie canonique de Wnt. Lorsque la voie des Wnt est inactive, la  $\beta$ -caténine s'associe avec le complexe de dégradation composé de l'Axin/APC/GSK3 $\beta$ . Elle est alors phosphorylée et dégradée par le protéasome. L'activation de la voie par la protéine WNT liée au récepteur FZ et au co-récepteur LRP5/6 entraîne le recrutement de DSH et de l'Axine à la membrane, ce qui inhibe la dégradation de la  $\beta$ -caténine qui s'accumule dans le cytoplasme et dans le noyau où elle régulera la transcription de ses gènes cibles. (Schéma inspiré des articles de Clark *et al.* 2012 et McNeill & Woodgett, 2010).



et que l'on peut muter la protéine afin d'affecter l'une ou l'autre (Orsulic & Peifer 1996 ; Valenta *et al.* 2011).

### **5.1 Rôle d'*arm* dans la voie des Wnt**

La voie des Wnt est une voie de signalisation extrêmement conservée, et régulant le développement et la mise en place de l'axe antéro/postérieur de l'embryon.

L'activation de cette voie de signalisation repose sur l'interaction entre le ligand extracellulaire WNT et son récepteur membranaire FZ.

En l'absence de WNT, la  $\beta$ -caténine/ARM libre dans le cytoplasme est ciblée par un complexe protéique composé d'Axine, d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) et de GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase kinase 3 $\beta$ ). La liaison d'ARM à ce complexe induit la phosphorylation de cette dernière par la GSK3 $\beta$  (Liu *et al.* 2002), ce qui entraîne son ubiquitination et par conséquent sa dégradation par le protéasome.

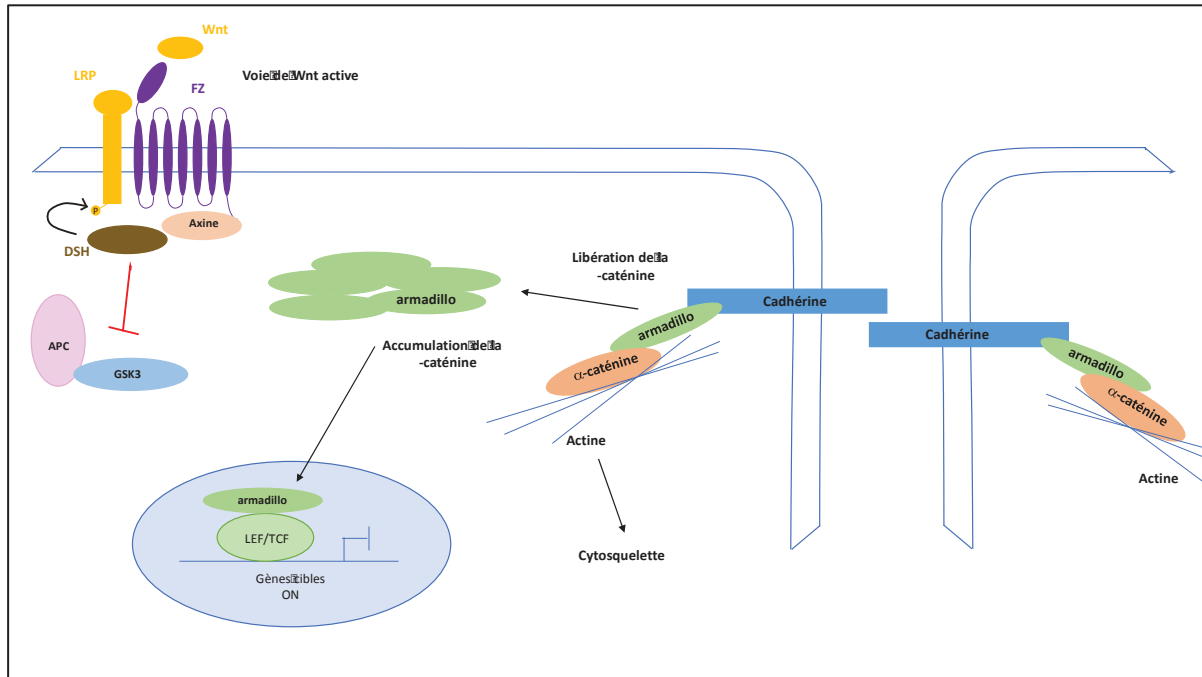
La fixation du ligand Wnt à son récepteur FZ et aux co-récepteurs LRP5/6 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein) entraîne le recrutement de DSH. DSH déstabilisera le complexe de destruction protéique en recrutant d'une part l'Axine et en permettant la phosphorylation d'autre part le récepteur LRP5/6 ce qui aura pour conséquence de bloquer l'activité kinase de GSK3 $\beta$  (Schwarz-Romond *et al.* 2007 ; Zeng *et al.* 2008). De ce fait, la protéine ARM non phosphorylée échappe à la dégradation, ce qui induit son accumulation dans le cytoplasme et ensuite sa translocation dans le noyau, où elle s'associe à des facteurs de transcription de la famille TCF/Lef (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor). Cette association TCF/ARM permet d'activer la transcription de certains gènes cibles impliqués dans le développement (**Figure 18**).



Différentes études ont montré le lien entre une dérégulation de cette voie des Wnt et le développement de maladies neurodégénératives (De Ferrari *et al.* 2006 ; Al-Harhi L. 2012).

La voie des Wnt semble être modulée par la préséniline1 (PS1), une  $\gamma$ -sécrétase clivant la protéine APP (Zhou *et al.* 1997). En condition physiologique, l'activité de GSK3 $\beta$  est inhibée par PS1 via l'activation d'Akt. Cependant, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentant une mutation de PS1, on observe une augmentation de l'activité de GSK3 $\beta$  et par conséquent une diminution de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique (Zhang *et al.* 1998 ; Kawamura *et al.* 2001). De plus, il a été établi que la formation de plaques amyloïdes entraîne une surexpression de la protéine DKK1 (Dickkopf-1) connue pour être un modulateur négatif de la voie des Wnt (Rosi *et al.* 2010 ; Purro *et al.* 2012). Inversement, la suractivation de la voie des Wnt induit une diminution de la production du peptide A $\beta$  et de l'activité de la  $\beta$ -sécrétase (Parr *et al.* 2015).

Un lien entre la  $\beta$ -caténine et la maladie d'Huntington a aussi été avancé. Godin *et al.* (2010) ont démontré que l'expression d'une forme HTT-polyQ entraîne une accumulation importante de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique sous une forme phosphorylée. Après avoir mis en évidence que la protéine HTT sauvage interagit aussi bien avec le complexe protéique Axine/APC/GSK3 $\beta$  qu'avec la  $\beta$ -caténine, ils ont démontré que la forme HTT-polyQ est incapable d'interagir avec la  $\beta$ -caténine. Cela entraîne à terme une diminution de l'interaction entre le complexe de destruction et la  $\beta$ -caténine, provoquant ainsi une augmentation et une stabilisation de cette dernière dans le cytoplasme. À l'inverse, il a été montré que la surexpression de certains composants du complexe de destruction chez des drosophiles exprimant les formes polyQ d'*htt* conférerait un effet neuro-protecteur en réduisant la quantité de  $\beta$ -caténine (Dupont *et al.* 2012).



**Figure 19 : Représentation schématique de la protéine ARM dans les jonctions adhérentes.** La  $\beta$ -caténine, fixée à la cadherine, est adressée à la membrane, puis l' $\alpha$ -caténine vient se fixer à ce complexe via la  $\beta$ -caténine. Lorsque ce complexe est déstabilisé, la  $\beta$ -caténine est libérée et sera accumulée ou dégradée suivant l'activation de la voie des Wnt. S'il y a accumulation, la protéine sera transportée au noyau pour permettre la transcription de gènes essentiels au maintien du cytosquelette. (Schéma inspiré des articles de Clark *et al.* 2012 et McNeill & Woodgett, 2010).

## 5.2 Rôle d'*arm* dans les jonctions adhérentes

La  $\beta$ -caténine/ARM est majoritairement localisée au niveau des jonctions cellulaires (**Figure 19**). Ces connections cellulaires, dépendantes des cadhérines, participent à la formation des tissus polarisés. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires, dont les régions extracellulaires forment des interactions homotypiques avec les cadhérines des cellules voisines. Leur domaine intracellulaire interagit avec la  $\beta$ -caténine de façon constitutive. L'interaction Cadhérine/ $\beta$ -caténine se fait au niveau du réticulum endoplasmique, après quoi les deux protéines migreront ensemble jusqu'à la membrane. Une fois dans le cytoplasme, l'interaction de la  $\beta$ -caténine avec la cadhérine permet d'empêcher sa dégradation (Hinc *et al.* 1994). Réciproquement, cette interaction protège la  $\beta$ -caténine du complexe de destruction Axine/APC/GSK3 $\beta$  (Huber & Weis 2001).

Une fois au niveau de la membrane, une partie de la région N-Terminale et de la première répétition de la  $\beta$ -caténine/ARM interagit avec l' $\alpha$ -caténine monomérique (Pokutta *et al.* 2000 ; Orsulic & Peifer 1996 ; Drees *et al.* 2005) permettant de stabiliser la  $\beta$ -caténine à la jonction (Brembeck *et al.* 2004). Cependant, cette liaison de l' $\alpha$ -caténine à la  $\beta$ -caténine peut indirectement influencer la dynamique de polymérisation de l'actine, sachant que l' $\alpha$ -caténine doit être dans un état homodimérique pour interagir avec l'actine (Benjamin *et al.* 2010).

L'interaction entre la cadhérine et la  $\beta$ -caténine/ARM est moléculairement dynamique. Le complexe peut être détruit par différentes protéases venant cliver la partie intercellulaire de la cadhérine, libérant alors la  $\beta$ -caténine et déstabilisant la jonction adhérente (Maretzky *et al.* 2005 ; Reiss *et al.* 2005). De même, l'interaction entre ces deux protéines peut être renforcée ou diminuée grâce à la phosphorylation de sites particuliers de



la cadhérine ou de la  $\beta$ -caténine (Huber & Weis 2001 ; Choi *et al.* 2006 ; Qi *et al.* 2006 ; Rhee *et al.* 2007 ; Coluccia *et al.* 2007).



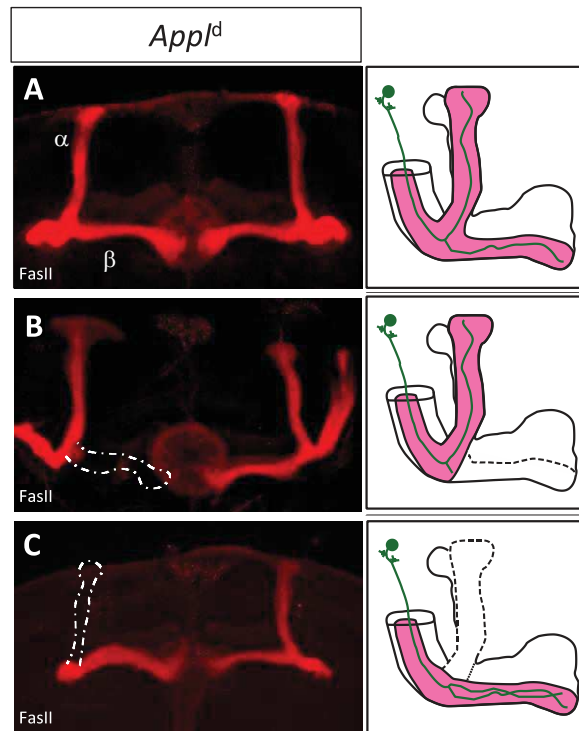


## Contexte et Objectifs de travail

Comme nous l'avons vu lors de cette introduction, le développement de certaine maladie neurodégénérative, telle que la MA et la MH, peut être imputé à la fois au gain de fonction de certaines protéines ou parties de protéines (APP et HTT respectivement) suite à une mutation mais aussi à la perte de fonction de ces dernières. Après de nombreuses années de recherches intenses sur les gains de fonction de ces protéines en conditions pathologiques, de nombreux travaux se focalisent maintenant sur les rôles physiologiques de ces protéines durant le développement et la maintenance cellulaire.

C'est dans cette optique que nous avons mené ces travaux. Nous avons pris avantage du modèle drosophile et de son système nerveux, afin de mieux comprendre la fonction de la protéine APPL pendant le développement des MB. Nous avons pris comme point de départ les travaux de l'équipe du Dr. Hassan dans lesquels a été démontré la fonction d'APPL en tant que co-récepteur dans la voie PCP lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Cette étude a démontré que le mutant *Appl<sup>d</sup>* induisait des défauts développementaux au niveau de ces neurones (**Figure 20**). Ils ont ainsi pu démontrer qu'APPL agissait au niveau de la pousse des axones  $\beta$ , en activant la voie PCP via la protéine ABL, vraisemblablement au niveau du cône de croissance (Soldano *et al.* 2013).

Nous avons cherché à déterminer de nouveaux interacteurs moléculaires à *Appl* et à la voie PCP dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$  et plus particulièrement dans la pousse



**Figure 20 : Défauts de développement des neurones  $\alpha/\beta$  chez le mutant *App1<sup>d</sup>*. (A-C) Cerveau de mâle adulte *App1<sup>d</sup>*. Marquage anti-FASII. (A) Développement normal des MB avec la présence des lobes  $\alpha$  et  $\beta$ . (B) Absence du lobe  $\beta$  (en pointillé) (C) Absence du lobe  $\alpha$  (en pointillé). En vert, représentation schématique d'un neurone  $\alpha/\beta$ .**

des axones  $\beta$ . Pour cela, j'ai observé l'effet de différents gènes mutés sur le phénotype produit par le mutant *Appl<sup>d</sup>* et par les différents membres de la voie PCP.

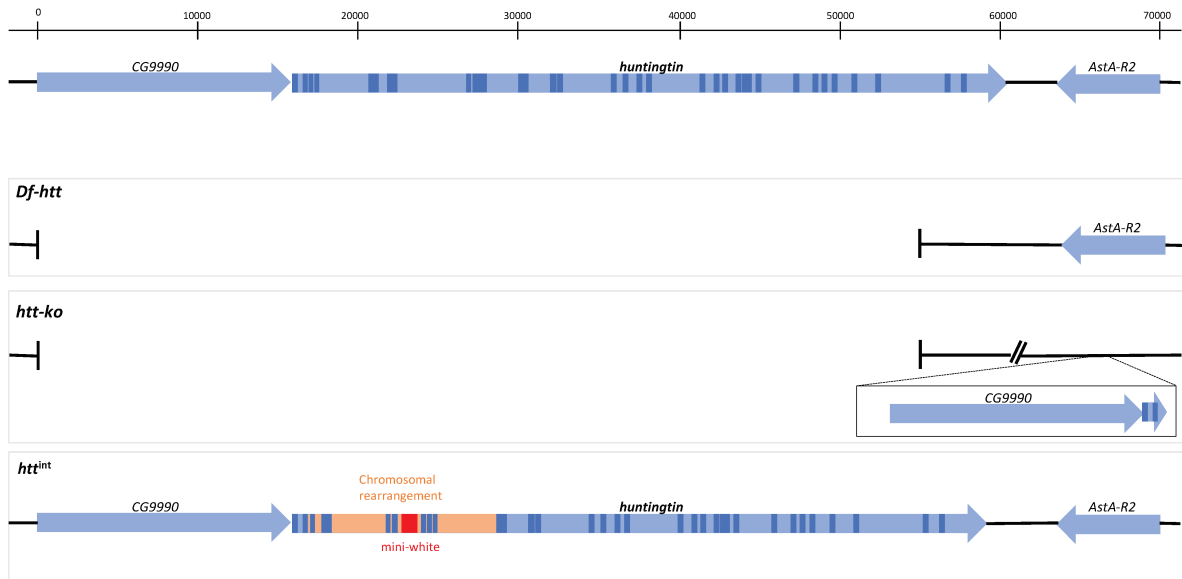
Dans le chapitre résultat, seront présentés les résultats majeurs obtenus durant ma thèse, selon quatre grandes parties.

La première développera les résultats démontrant les rôles d'APPL et HTT pendant la croissance axonale. Je démontre ici que ces protéines APPL et HTT agissent de façon antagoniste sur la régulation de l'activité de la protéine ABL pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$ .

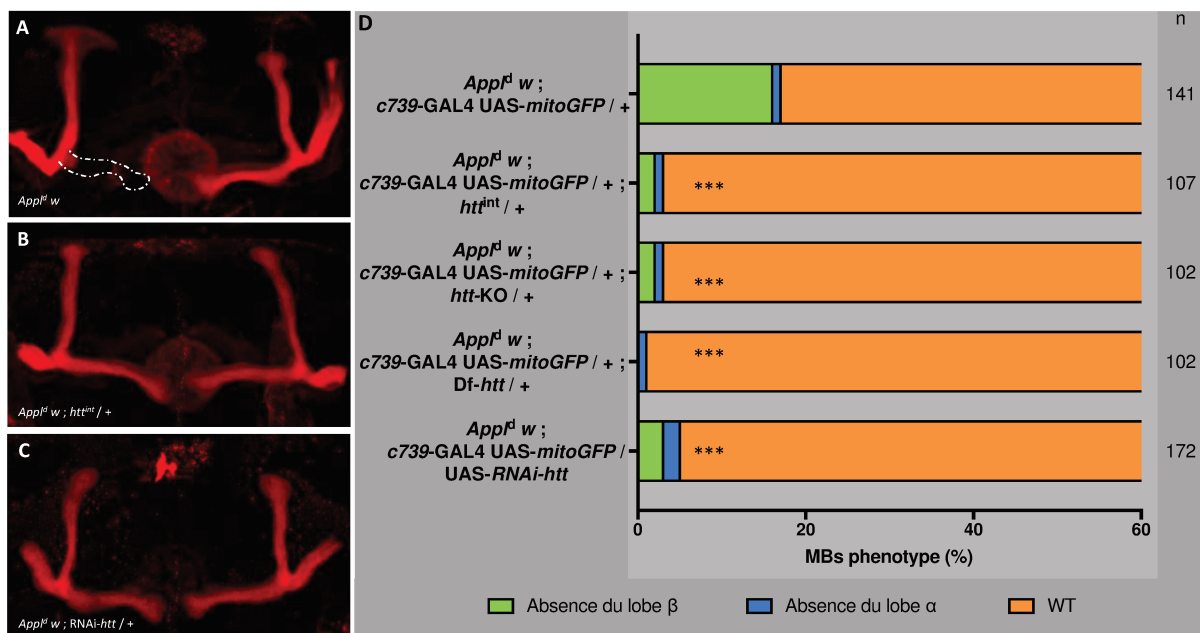
La deuxième partie traitera du rôle d'*arm* et de son interaction avec *Appl*, de façon indépendante de la voie PCP pour le développement des MB. Je démontre ici qu'APPL interagit avec la protéine ARM, via sa fonction au niveau des jonctions adhérentes et régulation du cytosquelette d'actine, dans les neurones  $\alpha/\beta$ .

La troisième partie détaillera moléculairement et phénotypiquement les nouveaux mutants *Appl* obtenus avec la technique du CRISPR.

Enfin la dernière partie traitera des résultats annexes d'autres interacteurs potentiels à *Appl*.



**Figure 21 :** Représentation schématique des différents allèles mutant du gène *htt*. La séquence du haut représente le chromosome d'origine. L'allèle *Df-htt* consiste en une délétion des gènes *CG9990* et *htt*. L'allèle *htt-ko* présente la même délétion, mais exprime dans son génome une construction génomique du gène *CG9990*. La différence entre les allèles *Df-htt* et *htt-ko* est la présence des deux premiers exons du gène *htt*, qui pourraient avoir un rôle. L'allèle *htt<sup>int</sup>* consiste en une délétion et réarrangement chromosomique au niveau des 8 premiers exons du gène *htt*. Cet allèle peut être suivie phénotypiquement grâce à l'insertion du gène *mini-white* dans *htt*.



**Figure 22 :** La perte de fonction d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$  sauve le phénotype mutant *App<sup>F1</sup>*. Tous les individus sont des mâles *App<sup>F1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .

# Résultats

## 1. Régulation d'ABL par des protéines associées à des neurodégénérescences, APPL et HTT, pour le développement des MB dans le cerveau de drosophile

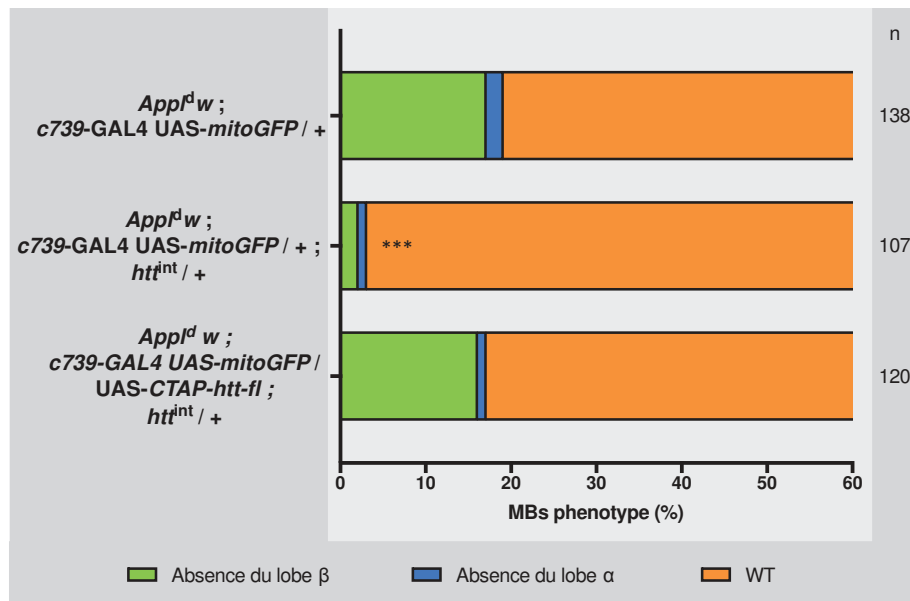
Dans l'optique de trouver des interacteurs moléculaires à *App1*, nous nous sommes intéressés à *htt*. Ce gène est associé à une maladie neurodégénérative chez l'homme, la maladie d'Huntington, tout comme l'homologue d'*App1* est associé à la maladie d'Alzheimer. Nous avons cherché à détecter s'il pouvait y avoir interaction génétique entre ces deux gènes affectant le développement des MB.

Le gène *htt* est porté par le 3<sup>ème</sup> chromosome. Nous travaillons avec 3 allèles mutants *Df-htt*, *htt-ko* et *htt<sup>int</sup>* (**Figure 21**). Chacun de ces allèles est décrit comme étant nul au niveau protéique pour HTT (Zhang *et al.* 2009 ; Dietz *et al.* 2015). Les allèles *htt-KO* et *htt<sup>int</sup>* sont viables à l'état homozygote, alors que l'allèle *Df-htt* est létal. Il a été démontré que cette létalité n'est pas due à *htt* lui-même mais au gène *CG9990* situé en amont d'*htt* (Zhang *et al.* 2009). La protéine HTT est exprimée de façon ubiquitaire dans le système nerveux de la drosophile.

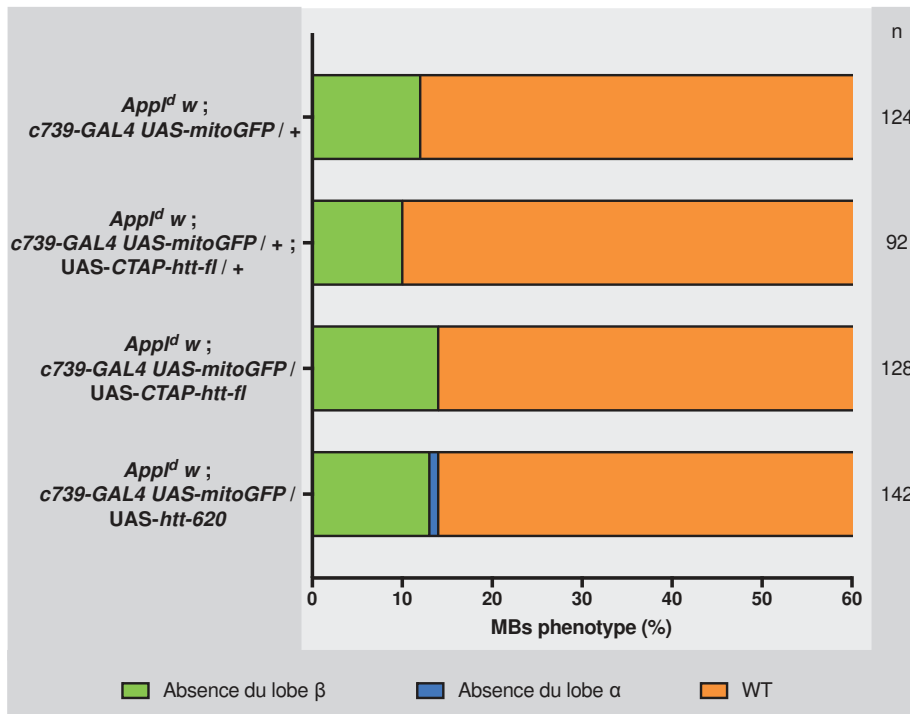
### 1.1 Le mutant *App1<sup>d</sup>* est sauvé par la perte de fonction partielle d'*htt*

Je me suis intéressée à une éventuelle interaction génétique entre *App1* et *htt* (**Figure 22**). De façon surprenante, alors que nous nous attendions à observer une aggravation du phénotype, nous avons remarqué que le mutant hétérozygote *htt<sup>-/+</sup>*, quel que soit l'allèle

utilisé, entraîne un sauvetage significatif de la perte du lobe  $\beta$  du mutant *App<sup>d</sup>*. À l'inverse, il semblerait que la perte du lobe  $\alpha$  soit insensible à une mutation d'*htt*.



**Figure 23 :** Le sauvetage d'*App<sup>d</sup>* par *htt<sup>int</sup>* est aboli par l'expression d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$ . L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*\* p < 0,001.



**Figure 24 :** La surexpression d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$  avec *c739-GAL4* ne modifie pas le phénotype mutant *App<sup>d</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

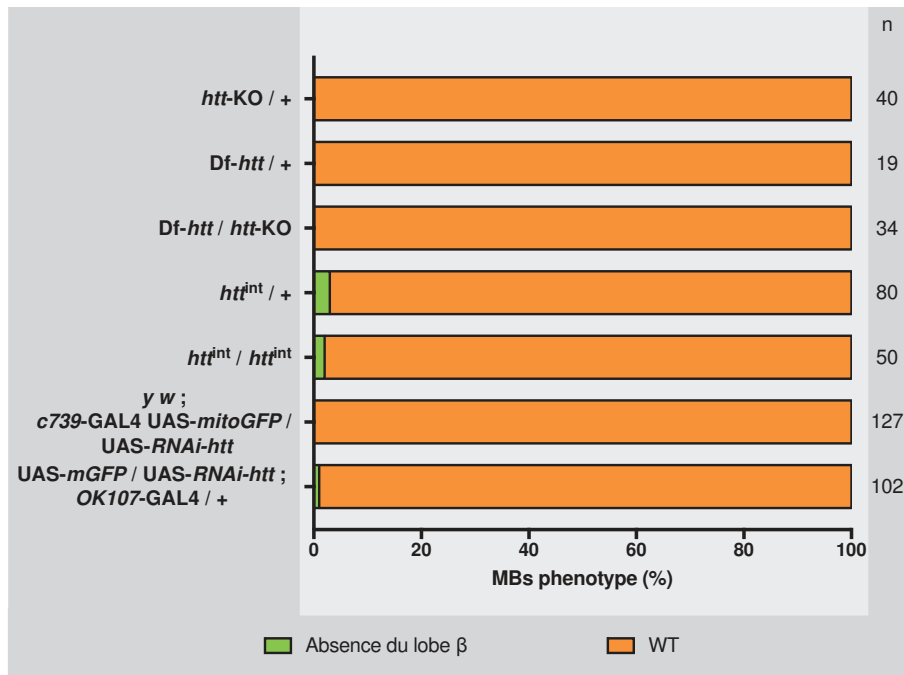
Afin de confirmer que ce sauvetage est autonome au MB, j'ai exprimé une construction d'ARN interférence (ARNi) contre *htt* spécifiquement dans les neurones  $\alpha/\beta$  grâce au GAL4 *c739* (**Figure 22**). L'expression de cet ARNi produit le même sauvetage significatif du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* qu'avec les différents allèles mutant d'*htt*.

Afin de démontrer que ce sauvetage est bien dû à la perte de fonction d'*htt*, j'ai essayé d'empêcher ce sauvetage en ré-exprimant *htt* dans les MB (**Figure 23**). Ainsi, alors que le mutant hétérozygote *htt<sup>int</sup>* permet de réduire à 2% la pénétrance de perte du lobe  $\beta$  du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*, l'expression d'*htt* grâce à l'*UAS-CTAP-htt-fl* dans ce contexte génétique rétablit un phénotype de 16% de perte du lobe  $\beta$ , correspondant à un phénotype du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* seul.

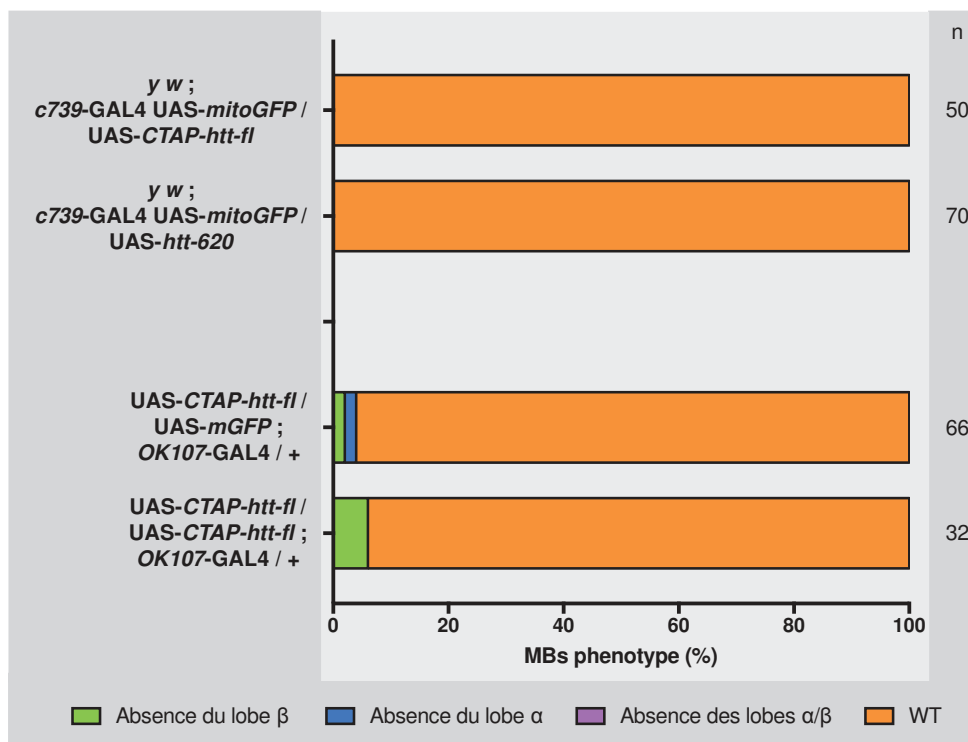
Ces différents résultats combinés démontrent que la perte de fonction partielle d'*htt* dans les MB permet de sauver le phénotype de perte du lobe  $\beta$  dû au mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*.

Je me suis ensuite intéressée à l'effet de la surexpression d'*htt* dans un contexte mutant pour *App<sup>l</sup>*. Si *htt* mutant peut sauver le phénotype *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*, il était possible d'imaginer que sa surexpression pouvait à l'inverse aggraver le phénotype (**Figure 24**). Pour cette expérience, j'ai disposé de différentes constructions UAS exprimant soit la séquence entière d'*htt* (*UAS-CTAP-htt-fl*), soit une séquence codant les 620 premiers acides aminés de la protéine (*UAS-myc-htt-620*). Chacune de ces deux formes est marquée respectivement soit par un tag *C-TAP*, soit par *myc*. Cependant, l'expression des différentes constructions n'entraîne aucun changement de phénotype chez un mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*.

Au vu de l'effet du mutant *htt* sur *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*, j'ai ensuite analysé l'effet du mutant et de la surexpression d'*htt* sur le développement des MB (**Figure 25**).



**Figure 25 :** La perte de fonction d'*htt* n'altère pas le développement des MB. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 26 :** La surexpression d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$  n'altère pas le développement des MB. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



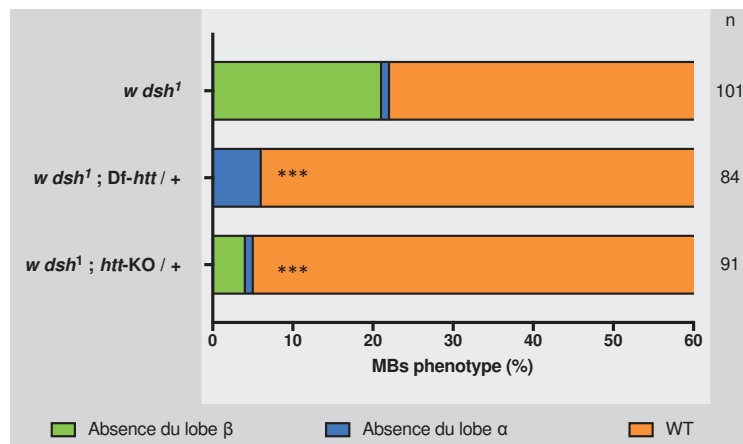
Tout d'abord, on observe qu'aucun des différents allèles ne produit de phénotype majeur à l'état hétérozygote (seul *htt<sup>int</sup>* semble avoir un très faible effet). De même, le phénotype à l'état homozygote *htt<sup>int</sup>* ou *Df-htt / htt-KO* est sauvage. Je retrouve les mêmes résultats lorsque j'exprime un ARNi contre *htt* dans les MB avec soit *c739-GAL4*, soit *OK107-GAL4*. Ces résultats recourent ceux obtenus dans l'étude de Zhang *et al.* 2009, dans laquelle ils montrent que le mutant *htt* ne produit pas de phénotype majeur lors du développement de la drosophile.

Pour finir, j'ai observé l'effet de la surexpression d'*htt* dans les MB (**Figure 26**). L'expression de la forme entière d'HTT ou des 620 premiers acides aminés par *c739-GAL4* ne produit aucun phénotype dans le développement des MB. Seule l'expression de la forme entière par *OK107-GAL4* entraîne un faible effet sur le développement des lobes  $\alpha$  et  $\beta$ . En forçant la surexpression d'*htt* avec deux doses de cet UAS avec *OK107-GAL4*, on observe qu'environ 5% de MB présentent un défaut du lobe  $\beta$ .

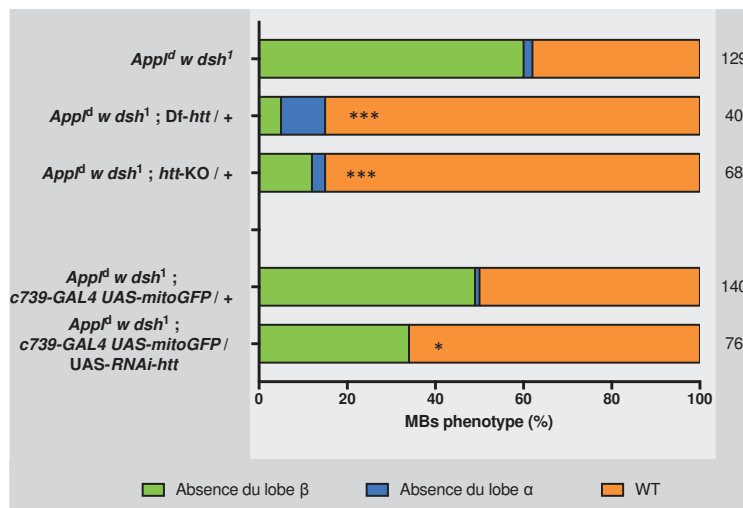
D'un point de vue général, le gain et la perte de fonction d'*htt* ne produit pas d'effet sur le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB.

De l'ensemble de ces résultats, bien que le mutant *htt* ne produise aucun phénotype en lui-même, le fait qu'il puisse affecter le phénotype du mutant *App<sup>l</sup>* démontre qu'il existe une interaction génétique entre *App<sup>l</sup>* et *htt* pour le développement des MB. J'ai par la suite

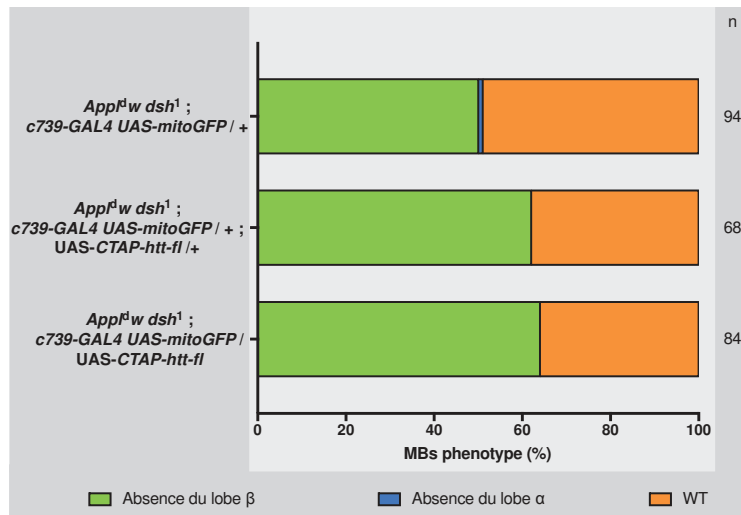
cherché à déterminer si cette interaction passait par la voie PCP. À cette fin, j'ai observé les interactions génétiques d'*htt* avec d'autres membres de la voie PCP, notamment *dsh*.



**Figure 27 :** La perte de fonction d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$  sauve le phénotype mutant *dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 28 :** La perte de fonction d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$  sauve le phénotype mutant *App1<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ .



**Figure 29 :** La surexpression d'*htt* dans les neurones  $\alpha/\beta$  n'affecte pas le mutant *App<sup>Δ</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

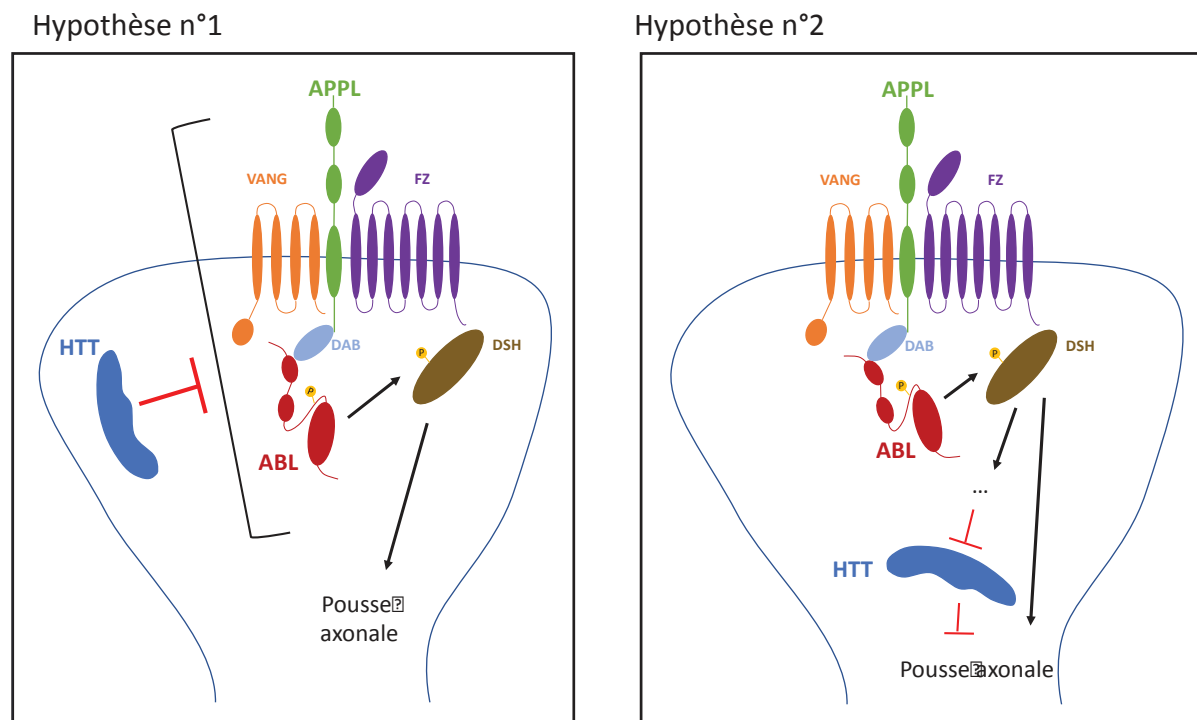
### 1.2 *htt* interagit génétiquement avec la voie PCP dans les neurones $\alpha/\beta$

Afin d'analyser une possible interaction d'*htt* avec la voie PCP, nous avons travaillé avec le gène *dsh*, porté par le chromosome X. L'allèle avec lequel nous travaillons, *dsh<sup>1</sup>*, correspond à la substitution d'une lysine en une méthionine en position 417 dans le domaine DEP. Ce domaine est connu pour être impliqué dans la localisation à la membrane de DSH et de sa fonction dans la voie PCP. Cet allèle *dsh<sup>1</sup>* a été décrit comme un allèle nul uniquement pour la voie PCP (Perrimon and Mahowald 1987 ; Axelrod 1998). Cet allèle est viable, ce qui nous permet de travailler avec des mâles adultes hémizygotés et des femelles homozygotes pour cette mutation.

Chez le mutant *dsh<sup>1</sup>*, nous retrouvons une perte du lobe  $\beta$  dans environ 20% des cas, confirmant les observations précédentes (Soldano *et al.* 2013 ; Ng 2012). Je démontre ici que la perte de fonction partielle d'*htt* permet de sauver de façon significative ce phénotype (**Figure 27**). Cependant, dans ce contexte la perte du lobe  $\alpha$  n'est pas empêchée. Ces résultats avec le mutant *dsh<sup>1</sup>* laissent penser qu'*htt* interagirait avec la voie PCP.

Afin de confirmer cette hypothèse, je me suis ensuite intéressée au sauvetage du double mutant *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* (**Figure 28**). Ce double mutant permet d'amplifier fortement le phénotype jusqu'à 60% de perte de lobe  $\beta$ . La perte de fonction d'*htt*, soit grâce aux mutants hétérozygotes, soit avec l'expression d'un ARNi contre *htt* dans les MB, induit dans tous les cas un sauvetage significatif du phénotype de perte du lobe  $\beta$ . La perte du lobe  $\alpha$  n'est pas modifiée par le mutant *htt*, comme nous l'avons déjà observée avec les mutants individuels *Appl<sup>d</sup>* et *dsh<sup>1</sup>*.

J'ai ensuite cherché à voir si la surexpression d'*htt* pouvait avoir un effet lorsqu'on était mutant à la fois pour *Appl* et *dsh* (**Figure 29**). L'expression de la forme entière d'*htt* avec



**Figure 30 :** Représentation schématique des deux hypothèses pouvant expliquer les résultats génétiques observés. L'hypothèse n°1 propose qu'HTT serait un régulateur négatif de la voie PCP, en inhibant un des membres de la voie. L'hypothèse n°2 serait qu'HTT serait un effecteur de la voie PCP, et serait naturellement régulé négativement par la voie.

*c739*-GAL4 chez le double mutant *App<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* entraîne une légère augmentation du phénotype, bien que non significative.

L'intégralité de ces expériences d'interaction génétique nous démontre qu'*htt* joue un rôle dans la voie PCP pour la pousse des axones  $\beta$ .

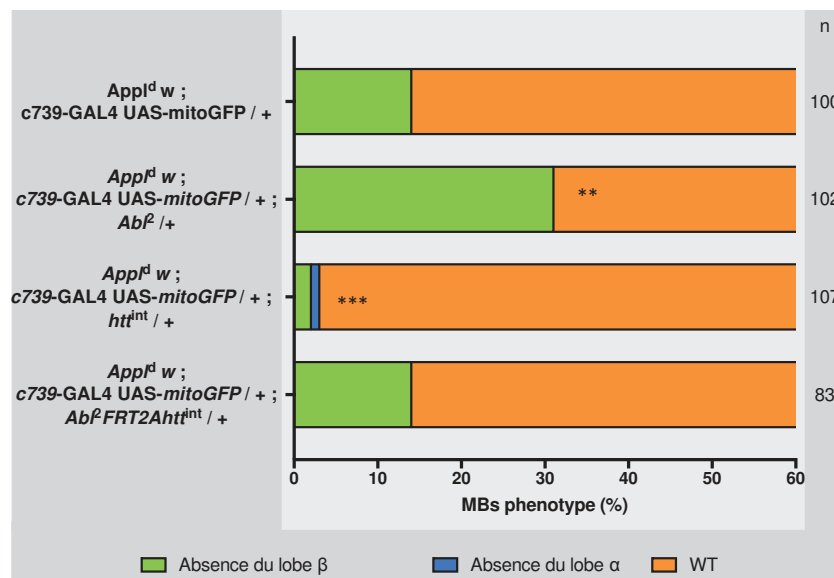
### 1.3 Interaction génétique entre *App*, *Abl* et *htt*

A ce stade, nous pouvons émettre deux hypothèses afin d'expliquer que la perte de fonction d'*htt* puisse sauver les différents mutants de la voie PCP (**Figure 30**) :

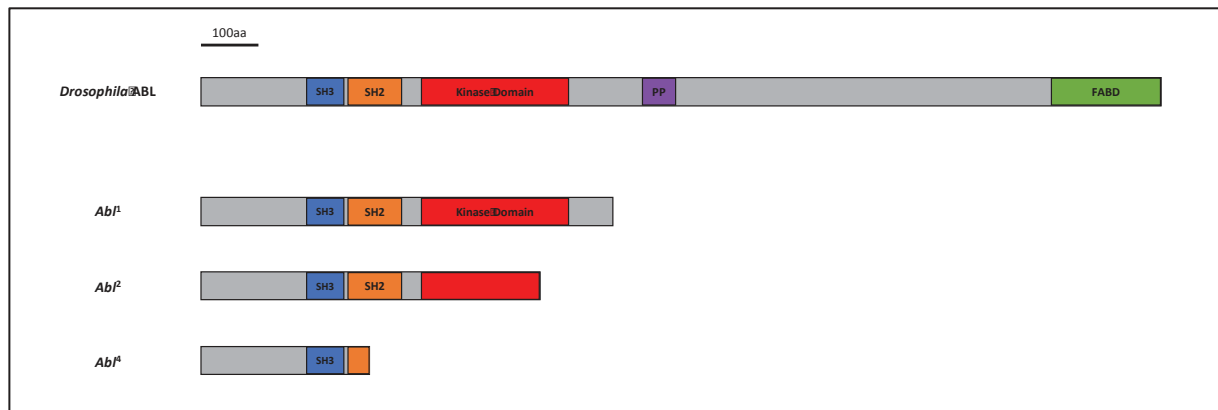
- La protéine HTT régulerait négativement la voie PCP en inhibant un des acteurs de la voie, ainsi lorsqu'on enlève la protéine HTT, son rôle inhibiteur est supprimé et la voie est de nouveau active.
- La protéine HTT serait régulée négativement par la voie PCP pour assurer une pousse normale des axones  $\beta$ .

Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur la première hypothèse, et avons cherché la cible potentielle d'HTT. Les protéines APPL et DSH ont été écartées de la liste des candidats. En effet, les mutants pour ces deux gènes étant des nuls pour chacune des protéines, nous ne pourrions pas voir d'amélioration du phénotype en enlevant *htt* si l'une ou l'autre était la cible d'HTT.

Dans la voie PCP, ABL étant un intermédiaire entre APPL et DSH, nous avons cherché à savoir s'il pouvait être la cible d'HTT. Soldano *et al.* (2013) ont démontré que l'activité kinase d'ABL est impliquée dans l'activation de la voie PCP par la phosphorylation de DSH. Le mutant hétérozygote *Ab1<sup>d</sup>* permet d'amplifier le phénotype du mutant *App1<sup>d</sup>* de perte du lobe β jusqu'à



**Figure 31 :** Analyse de l'interaction génétique du triple mutant *App1<sup>d</sup> Ab1<sup>d</sup> htt<sup>int</sup>*. L'analyse est faite dans des cerveaux de mâles adultes *App1<sup>d</sup>*. Le mutant hétérozygote *Ab1<sup>d</sup>* augmente le phénotype jusqu'à 30% de perte du lobe β. Le mutant hétérozygote *htt<sup>int</sup>* sauve le phénotype de perte du lobe β. Le double mutant *Ab1<sup>d</sup> htt<sup>int</sup>* n'affecte pas le phénotype de perte du lobe β. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 32 :** Représentation schématique de la protéine ABL et des différents mutants chez la drosophile. La protéine ABL est composée de certains domaines conservés : SH3 (Src Homology domain 3), SH2 (Src Homology domain 2), le domaine kinase, le domaine PP (PolyProline) et le domaine FABD (F-Actin Binding Domain). La protéine produite par le mutant *Abl<sup>1</sup>* est tronquée entre le domaine kinase et le domaine PP. Celle produite par le mutant *Abl<sup>2</sup>* est tronquée dans le domaine kinase. Enfin, celle produite par le mutant *Abl<sup>4</sup>* est tronquée dans le domaine SH2.

30%. A l'inverse, la surexpression d'*Abl* permet de sauver les phénotypes des mutants *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* (Soldano *et al.* 2013) et *dsh<sup>1</sup>* (résultats détaillés dans les résultats supplémentaires). Donc *Abl* est au cœur de la pousse axonale dépendante de la voie PCP.

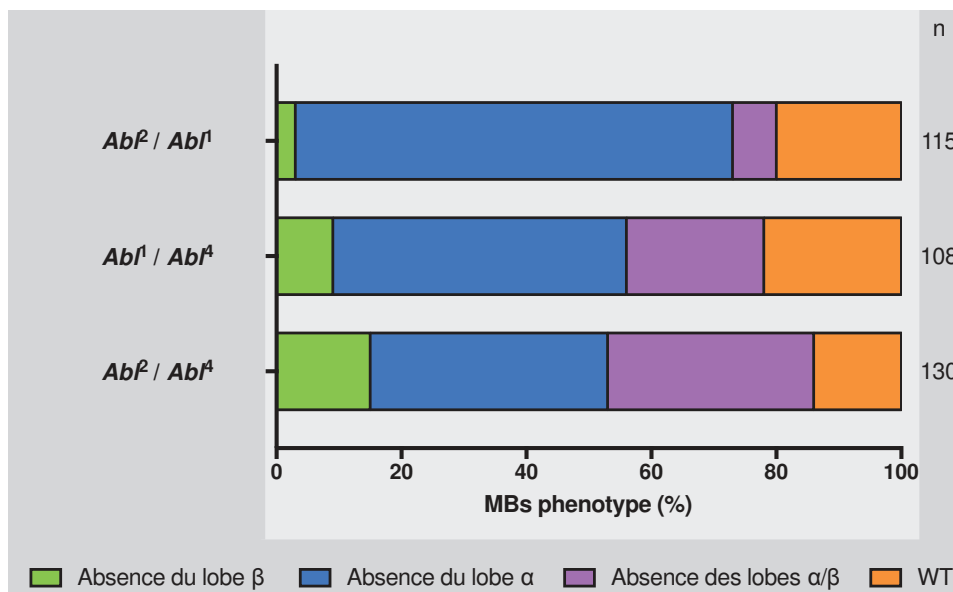
De plus il a déjà été établi que cette protéine ABL nécessite une régulation négative de son activité. Il n'est pas impossible de penser qu'HTT pourrait jouer un rôle dans la régulation négative d'ABL pendant la pousse axonale dans les MB.

J'ai montré précédemment que le mutant *htt* permet de sauver le phénotype mutant d'*App<sup>l<sup>d</sup></sup>*, alors qu'à l'inverse une mutation d'*Abl* induit une augmentation du phénotype. Dans l'hypothèse qu'HTT régulerait négativement ABL, j'ai regardé l'effet du double mutant *Abl<sup>2</sup> htt<sup>int</sup>*, à l'état hétérozygote, sur le mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* (**Figure 31**). Dans ce contexte, le phénotype est similaire à celui du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* seul, avec environ 15% de perte du lobe  $\beta$ . Ces résultats sont en accord avec un effet antagoniste d'HTT sur ABL, ce qui coïnciderait avec notre hypothèse, bien que cela ne la valide pas encore.

Suite à toutes ces données, nous nous sommes focalisés sur la possibilité d'une régulation d'ABL via la protéine HTT.

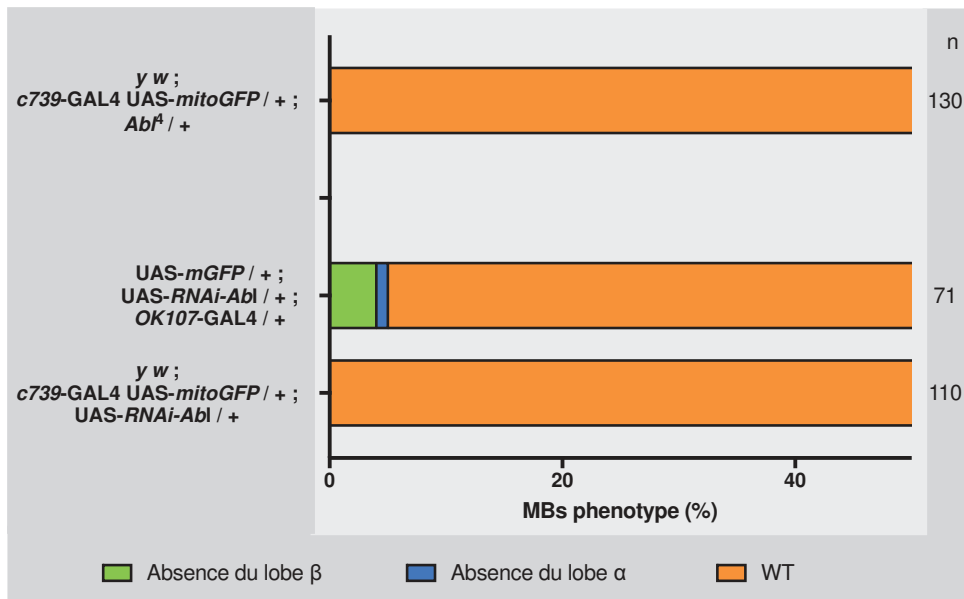
#### 1.4 Abi : acteur indispensable du développement des neurones $\alpha/\beta$ des MB

Suite à ces résultats, nous nous sommes focalisés sur le phénotype produit par *Abi* dans les MB. Le gène *Abi* se trouve sur le 3<sup>ème</sup> chromosome. Nous travaillons avec trois allèles mutants, *Abi*<sup>1</sup>, *Abi*<sup>2</sup> et *Abi*<sup>4</sup>, chacun produisant prématurément un codon stop dans la phase codante du gène (**Figure 32**). Ces 3 allèles mènent à la production de protéines tronquées (Smith & Liebl 2005). A l'état homozygote, ces 3 allèles sont létaux dès le début du développement. Cependant, il n'est pas bien défini si la létalité est due aux mutations dans la



**Figure 33 : Analyse du phénotype des MB en condition mutante trans-hétérozygote pour *Abi*.** La combinaison des différents allèles mutant d'*Abi* conduit à des défauts développementaux des MB atteignant les lobes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cerveaux de pupes 48H. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés





**Figure 34 : Analyse du phénotype des MB en condition mutante hétérozygote pour *Abl*.** La perte de fonction partielle d'*Abl* n'entraîne pas de défauts majeurs lors du développement des MB. Cerveaux adultes. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

séquence d'*Abl* ou à d'autres mutations survenues ailleurs sur le chromosome.

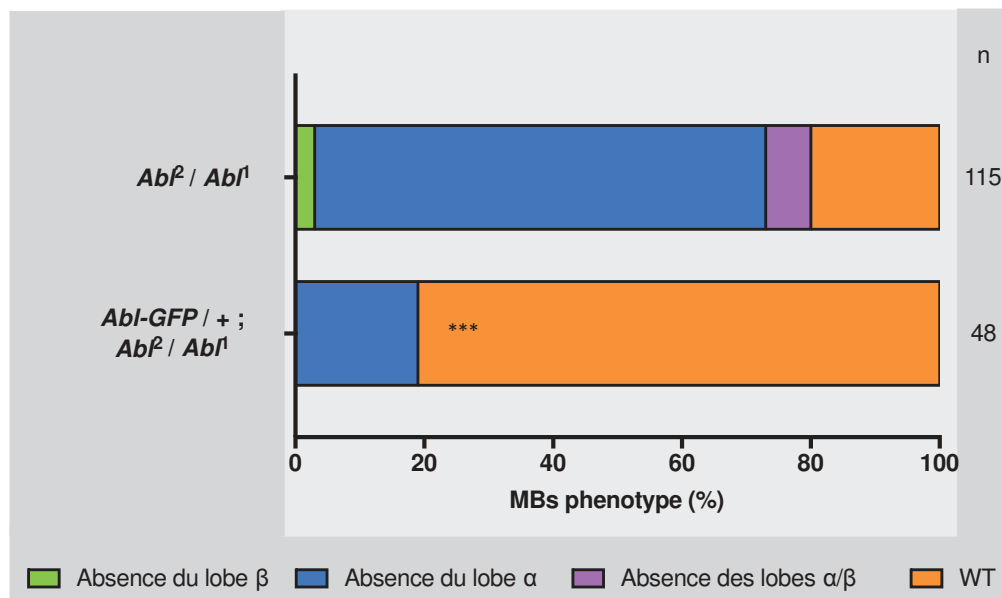
#### 1.4.1 Analyse du mutant *Abl*

Afin d'étudier le phénotype des mutants *Abl* dans les MB, j'ai travaillé en condition de trans-hétérozygote :  $Abl^2 / Abl^1$ ,  $Abl^1 / Abl^4$  et  $Abl^2 / Abl^4$ . Bien qu'aucune des trois combinaisons d'allèles ne soit viable à l'âge adulte, j'ai pu observer le phénotype des MB en disséquant les pupes âgées de 48 heures (**Figure 33**). Dans ces conditions, on observe que chacune des trois combinaisons produit des défauts importants lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Seul 15 à 20% des MB sont sauvages. En moyenne, les défauts du lobe  $\alpha$  sont prédominants, bien que le lobe  $\beta$  soit aussi affecté. Dans des proportions allant de 10 à 30%

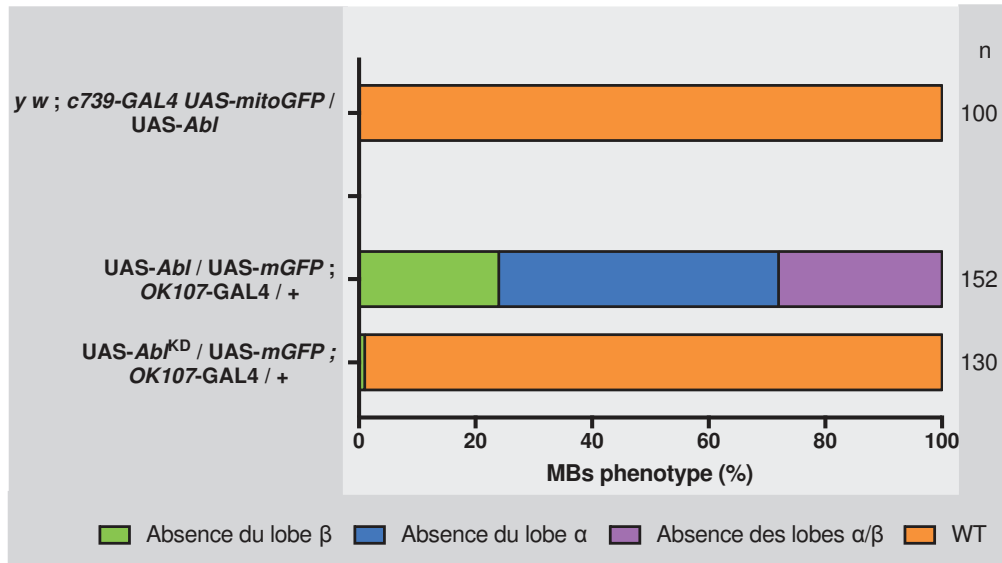
suivant la combinaison d'allèles utilisée, les lobes  $\alpha$  et  $\beta$  sont absents simultanément. La forte pénétrance du phénotype chez les mutants *AbI* montre, de façon très claire, le rôle central de cette protéine dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ .

Devant cette pénétrance du phénotype à l'état trans-hétérozygote, j'ai observé l'effet de l'hétérozygote *AbI<sup>4</sup>* sur le développement des neurones  $\alpha/\beta$  (**Figure 34**). Chez ces individus, 100% des neurones  $\alpha/\beta$  sont sauvages. Une seule dose d'*AbI* est suffisant pour assurer la fonction de la protéine.

Afin de contourner la létalité des mutants trans-hétérozygotes à l'âge adulte, j'ai tenté de reproduire ce phénotype chez des individus adultes en utilisant des ARN interférence (**Figure 34**). Lorsque j'exprime l'ARNi dans les neurones  $\alpha/\beta$  avec *c739-GAL4*, aucun défaut n'est observé. Lorsque je l'exprime avec *OK107-GAL4*, seul 5% des lobes  $\beta$  sont absents. Dans ces conditions, l'utilisation d'ARNi contre *AbI* ne permet pas d'obtenir le même type de



**Figure 35 : Sauvetage du mutant trans-hétérozygote *AbI* par la surexpression d'*AbI*.** *AbI<sup>2</sup> / AbI<sup>1</sup>* : Cerveaux de pupes 48H ; *AbI-GFP / + ; AbI<sup>2</sup> / AbI<sup>1</sup>* cerveaux adultes. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype sauvage: \*\*\* p < 0,001.



**Figure 36 : Analyse de la surexpression d'*Abl* dans les MB.** Cerveaux adultes. La surexpression d'*Abl* par *c739-Gal4* n'entraîne aucun défaut dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . La surexpression d'*Abl* par *OK107-Gal4* entraîne des défauts dans 100% des cas. La surexpression d'une forme kinase dead (*Abl<sup>KD</sup>*) par *OK107-Gal4* n'entraîne aucun défaut dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

phénotype qu'avec les mutants trans-hétérozygotes. Toutefois, on peut imaginer qu'en associant l'ARNi à un UAS-Dicer2 et/ou en contexte *Abl<sup>+/+</sup>*, nous pourrions amplifier l'effet de la construction et avoir un phénotype plus important en l'exprimant avec *OK107-GAL4*.

Afin de confirmer que les phénotypes observés sont bien dus aux mutations d'*Abl* et non à d'autres éventuelles mutations sur le chromosome, j'ai effectué un sauvetage de ces mutants en exprimant une construction génomique d'*Abl* (**Figure 35**). Tout d'abord, la construction *Abl* ne permet pas de sauver la létalité du mutant *Abl<sup>2</sup>* à l'état homozygote. Par contre, la létalité du trans-hétérozygotes *Abl<sup>2</sup> / Abl<sup>1</sup>* est sauvée grâce à cette construction, puisque 100% des pupes de ce génotype ont éclos (n=24). En plus de sauver la létalité du mutant trans-hétérozygote, cette construction sauve aussi de façon significative le phénotype

des MB. En effet, les mutants *Abl* exprimant une construction génomique *Abl* ont 80% des MB sauvages. Seul 20% d'entre eux présentant une perte du lobe  $\alpha$ .

Ces résultats confirment que la létalité embryonnaire observée chez les trois allèles homozygotes est bien due à d'autres mutations dans le génome. D'autre part, cela confirme que la létalité en fin de stade pupal des mutants trans-hétérozygotes est bien due à *Abl* lui-même. Enfin, le phénotype observé dans les MB chez les trans-hétérozygotes est la conséquence de la perte de fonction d'*Abl*.

#### 1.4.2 Analyse de la surexpression d'*Abl*

Les données bibliographiques ont montré que chez l'homme, les effets toxiques d'*Abl* apparaissent lorsque cette protéine est constitutivement activée. J'ai donc voulu déterminer si nous pouvions reproduire un phénotype mutant dans les MB en surexprimant *Abl*. Pour cela, j'ai utilisé une construction UAS-*Abl* que j'ai exprimé spécifiquement dans les neurones

Clone		WT	lobe $\alpha$ absence	lobe $\beta$ absence	/ lobe $\alpha$ absence	n=	n MB
WT	NB	100%	0%	0%	0%	22	124
<i>Abl</i> <sup>1</sup>	NB	92%	4%	4%	0%	77	332
<i>Abl</i> <sup>2</sup>	NB	90%	10%	0%	0%	48	258
<i>Abl</i> <sup>4</sup>	NB	82%	11%	7%	0%	45	306

**Figure 37 : Analyse des clones MARCM de neuroblastes.** Les clones ont été induits en L1 suite à un choc thermique d'une heure à 37°C. NB=Neuroblaste. n = nombre de clones observés. n MB = nombre de MB observés.

$\alpha/\beta$  (Figure 36). L'expression de cette construction avec *c739-GAL4* ne produit aucun phénotype.

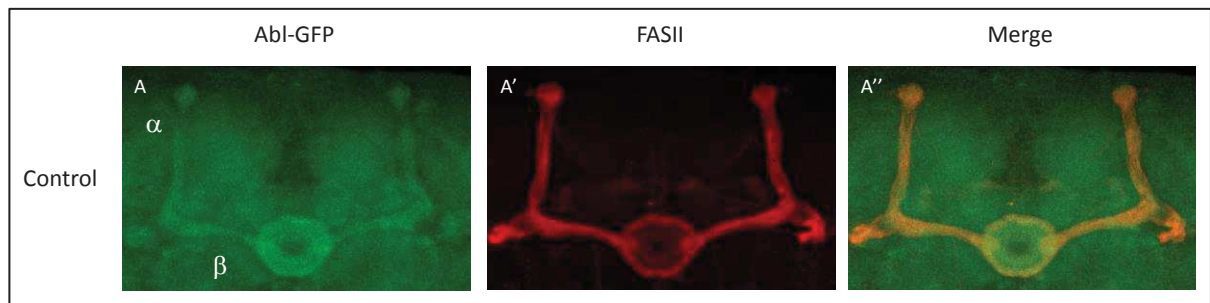
Cependant, lorsque je l'ai exprimé avec *OK107-GAL4*, 100% des MB étaient mutants. On peut voir qu'il y a un biais vers la perte du lobe  $\alpha$ , bien que le développement du lobe  $\beta$  soit aussi affecté. Environ 30% des MB sont mutants à la fois pour les lobes  $\alpha$  et  $\beta$ . Afin de confirmer que l'effet sur le développement des MB est bien dû à la suractivité d'ABL, j'ai exprimé une construction *Abl* dont l'activité kinase a été abolie (*UAS-Abl<sup>KD</sup>*). On voit que dans cette condition 99% des MB sont sauvages.

De façon intéressante, on voit que la perte et le gain de fonction d'*Abl* produisent les mêmes types de défauts sur le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . De plus, je montre avec ces

expériences de gain de fonction que ces défauts sont dus à une activité kinase trop importante de la protéine ABL. Ce qui confirme les données obtenues par les précédentes études sur ABL affirmant que cette protéine nécessite une régulation contrôlée de son activité. Trop ou pas assez d'activité affecte négativement la croissance des neurones  $\alpha/\beta$ .

#### 1.4.3 Analyse des clones MARCM canoniques *Abl*

Nous avons vu que les mutants *Abl* induisent des défauts dans le développement des lobes  $\alpha$  et  $\beta$ . Je me suis ensuite demandée quels étaient les phénotypes cellulaires de ces mutants, et si ces défauts étaient dus à un effet autonome cellulaire d'*Abl*. Pour répondre à ces deux questions, j'ai réalisé des clones MARCM canonique avec les différents allèles mutants du gène *Abl* (**Figure 37**). J'ai tout d'abord réalisé des clones neuroblastes, ce qui nous a permis de voir que pour chacun des trois allèles, la majorité des clones (entre 82 et 92% suivant l'allèle utilisé) était sauvage. Seulement 4 et 11% des clones montraient une perte du



**Figure 38 :** Analyse de l'expression d'ABL dans les MB. La construction *Abl-GFP* s'exprime sous le contrôle du promoteur endogène d'*Abl*. Cerveaux de pupes 48H.

lobe  $\alpha$  et 4 à 7% montraient une perte du lobe  $\beta$ . L'absence de phénotype chez ces clones contraste avec les phénotypes importants obtenus avec les trans-hétérozygotes.

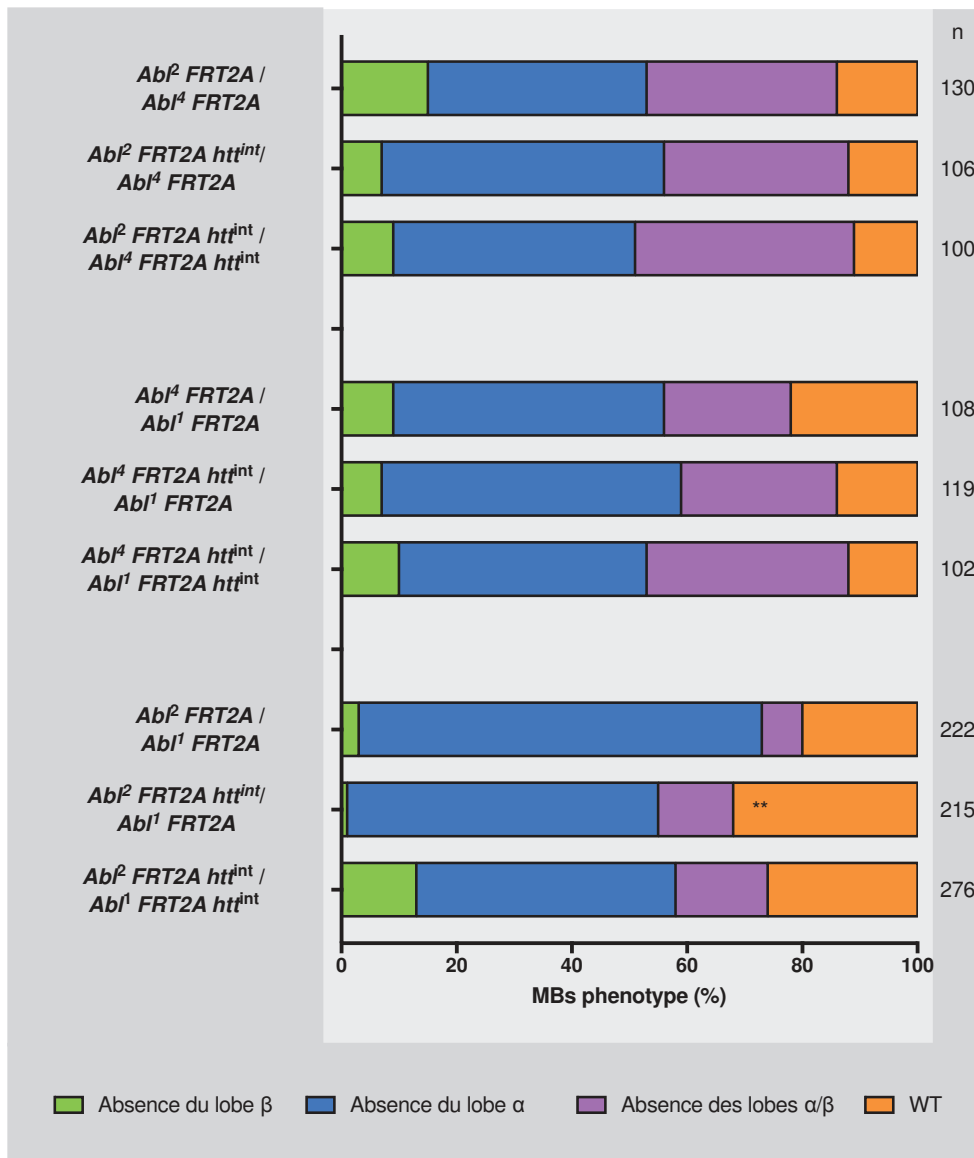
Suite à ces résultats surprenants, l'hypothèse que nous proposons est que, tout comme d'autre membre de la voie PCP (*dsh*, *Vang*, *fz*) (Ng 2012), l'effet d'*Abl* serait non autonome cellulaire mais autonome au niveau des MB. Avec les clones neuroblastes, seul au maximum  $\frac{1}{4}$  des neurones est mutant pour *Abl*, et ce sont les  $\frac{3}{4}$  restant, sauvages et poussant normalement, qui entraînent les neurones mutants avec eux pendant le développement. On ne peut pas exclure l'hypothèse que les modifications associées aux chromosomes mutants *Abl*<sup>1/2/4</sup> puissent sauver le phénotype des MB, même si cela reste peu probable.

Afin de répondre à la question du phénotype cellulaire, je suis en train de réaliser des clones MARCM de visualisation. Avec cette technique nous pourrions toujours suivre un neurone mutant, mais cette fois-ci dans un cerveau lui aussi homozygote mutant pour *Abl*.

#### 1.4.4 Analyse de l'expression d'ABL

Nous avons pu mettre en avant un effet des mutants *Abl* dans les MB, cependant après les résultats négatifs concernant l'autonomie cellulaire d'*Abl* dans les MB, j'ai voulu vérifier l'expression d'*Abl* au niveau des MB. En l'absence d'anticorps contre ABL chez la drosophile, je me suis servie de la construction génomique *Abl* associée à la GFP. J'ai observé le profil d'expression de cette construction à différents temps du développement : stade larvaire L3, stade pupal 48H, stade adulte. Aux stades larvaire et adulte l'expression d'ABL est ubiquitaire. C'est à 48H APF que l'expression d'*Abl*-GFP dans les MB est la plus visualisable (**Figure 38**). Il est intéressant de noter qu'à ce stade, les neurones  $\alpha/\beta$  sont en train de pousser, ce qui coïncident avec le fait que l'expression d'*Abl* est indispensable au développement de ces neurones.





**Figure 39 :** Analyse de l'interaction génétique entre *Abi* et *htt*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  : \*\*  $p < 0,01$ . Les tests statistiques analysent le nombre de MB sauvage entre les différentes conditions.

## 1.5 Abl interagit génétiquement avec htt

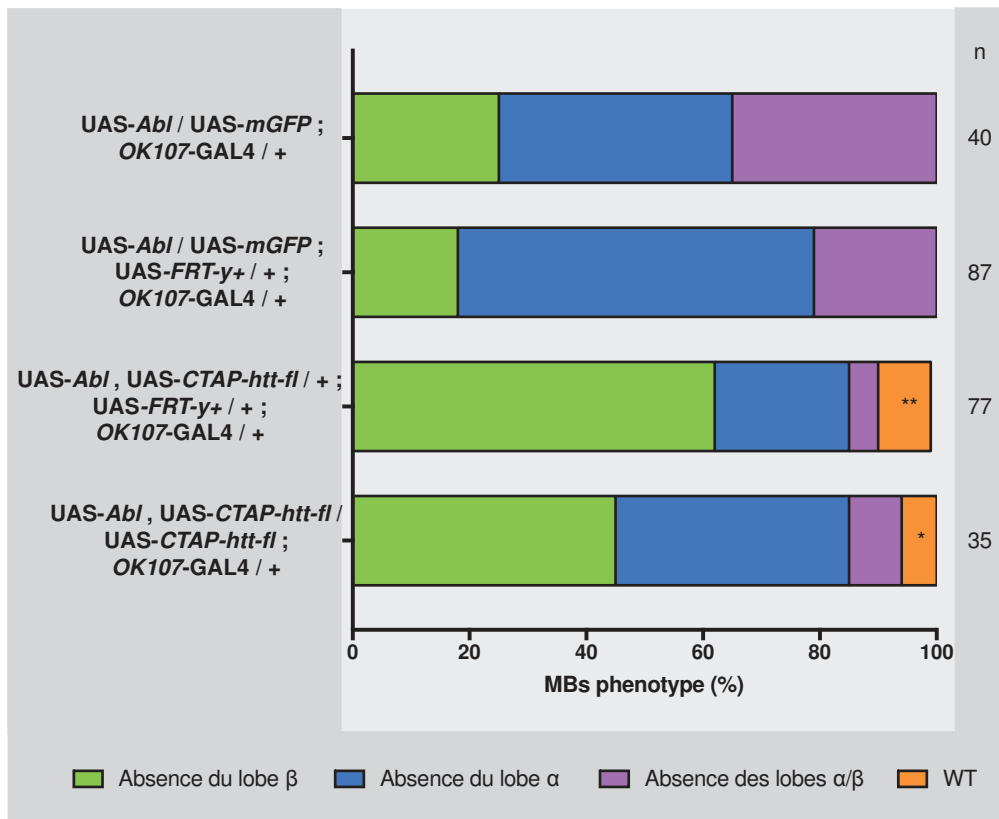
### 1.5.1 Analyse du double mutant Abl htt

Afin de déterminer si ABL pouvait être une cible d'HTT dans les MB, j'ai réalisé des expériences d'interaction génétique entre ces deux gènes. Pour cela, j'ai recombiné chacun des trois allèles *Abl* mutant avec le mutant *htt<sup>int</sup>* (les deux gènes se trouvent sur le 3<sup>ème</sup> chromosome).

Selon notre modèle, HTT permettrait de réguler négativement la protéine ABL. Afin de valider cette hypothèse, nous avons pensé qu'en étant mutant nul pour *Abl*, la perte d'*htt* ne devrait pas être en capacité de sauver le phénotype mutant, puisque *htt* n'aurait plus de cible à libérer. Dans un premier temps, j'ai observé l'effet du mutant *htt<sup>int</sup>* sur le mutant trans-hétérozygote *Abl<sup>2</sup> / Abl<sup>4</sup>* (**Figure 39**). Ces deux allèles produisent les fragments les plus courts de la protéine ABL, altérant tous les deux son activité kinase. La létalité en fin de stade pupal de ce mutant n'étant pas sauvée par la perte de fonction d'*htt*, j'ai observé le phénotype des pupes âgées de 48H. Nous pouvons voir que la pénétrance des phénotypes mutants du trans-hétérozygote *Abl<sup>2</sup> / Abl<sup>4</sup>* n'est absolument pas affectée par le mutant *htt<sup>int</sup>* à l'état hétérozygote ou homozygote.

J'ai reproduit les mêmes résultats en travaillant cette fois ci avec les allèles *Abl<sup>4</sup>* et *Abl<sup>1</sup>*. En effet, les phénotypes de ce mutant trans-hétérozygote ne sont pas affectés par le mutant *htt<sup>int</sup>*.

Par contre, lorsque j'ai utilisé les allèles *Abl<sup>2</sup>* et *Abl<sup>1</sup>*, j'ai pu mettre en évidence un sauvetage significatif du nombre MB sauvage en étant mutant hétérozygote pour *htt<sup>int</sup>*. Etrangement ce sauvetage n'est pas reproduit par le mutant *htt* homozygote bien qu'il y a une augmentation du nombre de MB sauvage comparé au mutant *Abl*.

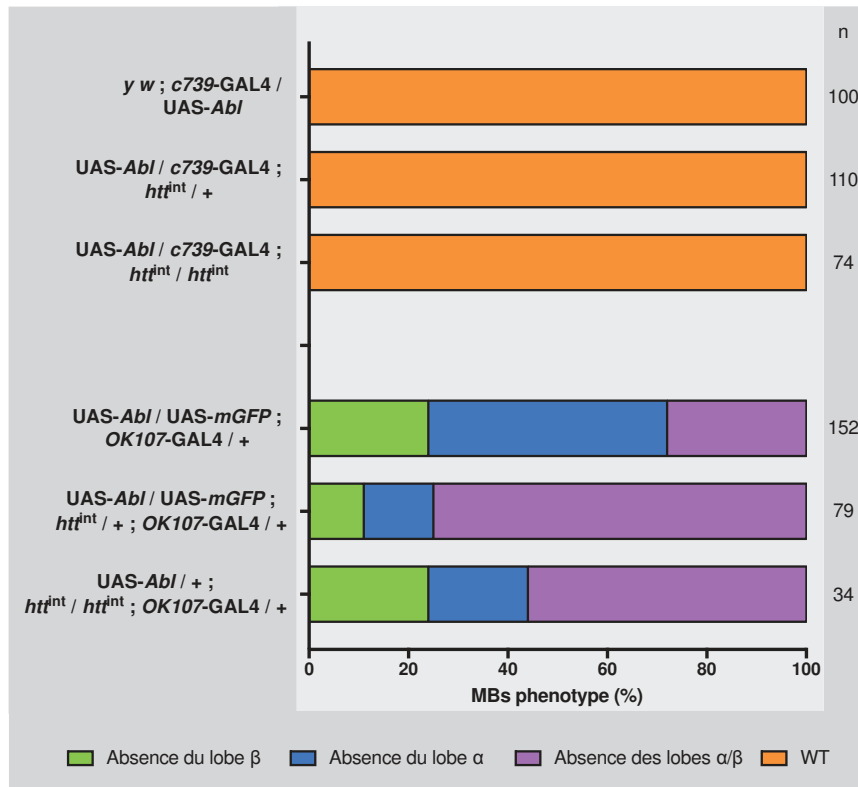


**Figure 40 : Analyse de l'interaction génétique entre *Abl* et *htt* en condition de double surexpression.** L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  : \*\* p < 0,01, \* p < 0,05. Les tests statistiques analysent le nombre de MB sauvage entre les différentes conditions.

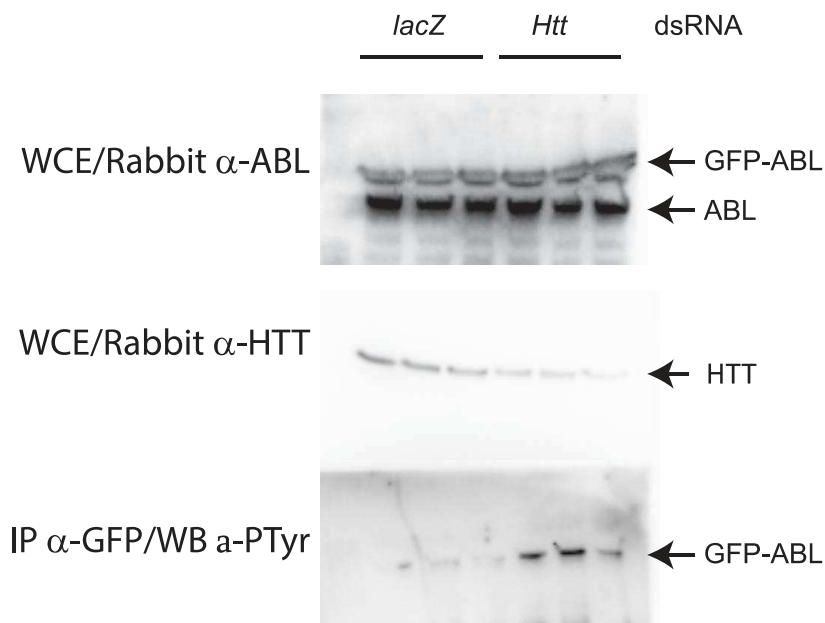
Ces expériences nous montrent que la perte d'*htt* ne parvient pas à sauver le mutant *Abl<sup>2</sup> / Abl<sup>4</sup>*, similaire à un nul pour l'activité kinase d'ABL (**Figure 32**), alors qu'elle peut sauver les mutants des autres membres de la voie PCP. Le fait que le mutant *Abl<sup>2</sup> / Abl<sup>1</sup>* puisse quant à lui être sauvé peut s'expliquer par le fait que *Abl<sup>1</sup>* soit hypomorphe pour la protéine. Cet allèle produit le domaine kinase (**Figure 32**) et nous avons montré que ce dernier est essentiel à la fonction d'ABL dans le développement des MB. Dans cette combinaison d'allèles un certain niveau d'activité ABL sauvage semble donc présent et, au final, semble pouvoir assurer sa fonction lorsqu'on diminue la quantité de protéine HTT.

### 1.5.2 Analyse de la double surexpression

Après avoir montré l'effet d'*htt* sur la perte de fonction d'*Abl*, je me suis ensuite intéressée au phénotype de gain de fonction d'*Abl* (**Figure 40**). Si HTT permet de réguler négativement ABL, nous devrions pouvoir réduire les effets de la surexpression d'*Abl* en surexprimant *htt* simultanément. Ces expériences ont été réalisées avec le même nombre de construction UAS dans chaque génotype, afin d'éviter toute situation de titration du GAL4. L'expression d'UAS-*Abl* avec *OK107*-GAL4 produit 100% de phénotypes mutants, avec un biais vers la perte du lobe  $\alpha$ . Lorsque j'exprime dans ce contexte une dose l'UAS-*CTAP-htt-fl*, 10% des MB se développent normalement. Ce développement significatif de MB sauvage est aussi observé lorsque j'ai exprimé deux doses d'UAS-*CTAP-htt-fl* bien que la proportion de MB sauvage soit plus faible. Outre l'apparition de MB sauvage, on observe que le biais des phénotypes mutants vers la perte du lobe  $\alpha$  est considérablement réduit et tend plutôt vers la perte du lobe  $\beta$ .



**Figure 41 :** Analyse de l'interaction génétique entre la surexpression d'*Abl* et la perte de fonction d'*htt*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 42 :** La phosphorylation d'ABL est augmentée en condition Knock-down pour *htt* en cellules S2. Les cellules S2 ont été transfectées avec une construction *Abl-GFP*, puis avec une construction dsRNA soit contre *lacZ* (contrôle), soit contre *htt* (Knock down *htt*). Le haut du panel, nous montre la détection de la protéine ABL endogène, et GFP-ABL avec un anticorps anti-ABL. Le panel du milieu nous montre une diminution de la quantité d'HTT en condition knock-down *htt* comparé à la condition contrôle. Le bas du panel nous montre une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine ABL après immunoprécipitation de la GFP (donc ici GFP-ABL) en condition knock-down *htt* comparé à la condition contrôle.

J'ai cherché à voir si on pouvait aggraver le phénotype du gain de fonction d'*Abl* en étant mutant pour *htt* (**Figure 41**). Tout d'abord avec *c739-GAL4*, l'expression d'*UAS-Abl* ne produit aucun phénotype. Dans ce contexte, le mutant hétérozygote ou homozygote *htt<sup>int</sup>* n'induit aucun phénotype non plus.

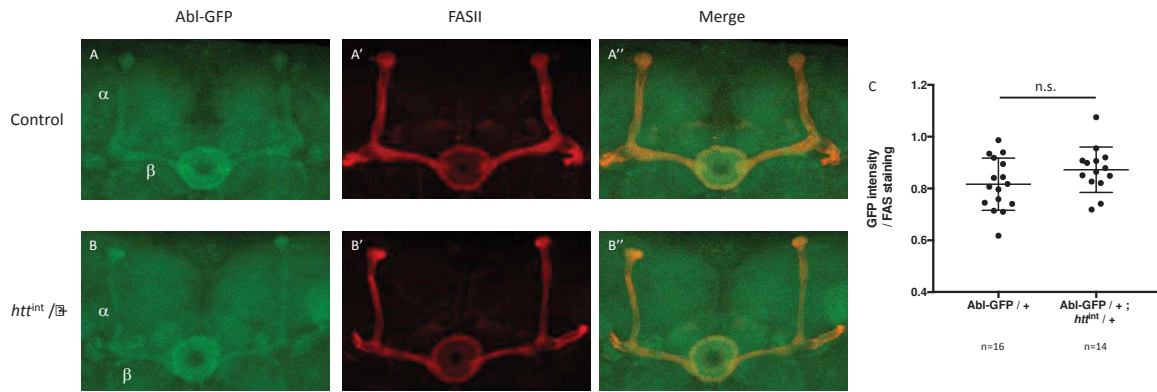
En revanche, lorsqu'on est dans une situation où l'*UAS-Abl* est exprimé avec *OK107-GAL4*, le mutant *htt<sup>int</sup>* modifie la pénétrance du phénotype mutant en augmentant significativement le biais vers une perte simultanée des lobes  $\alpha$  et  $\beta$ .

Le fait que l'on puisse voir une modulation des phénotypes de perte et gain de fonction d'*Abl* en modulant l'expression d'*htt* dans les MB soutient l'hypothèse selon laquelle la fonction d'ABL dans les MB est négativement régulée par HTT.

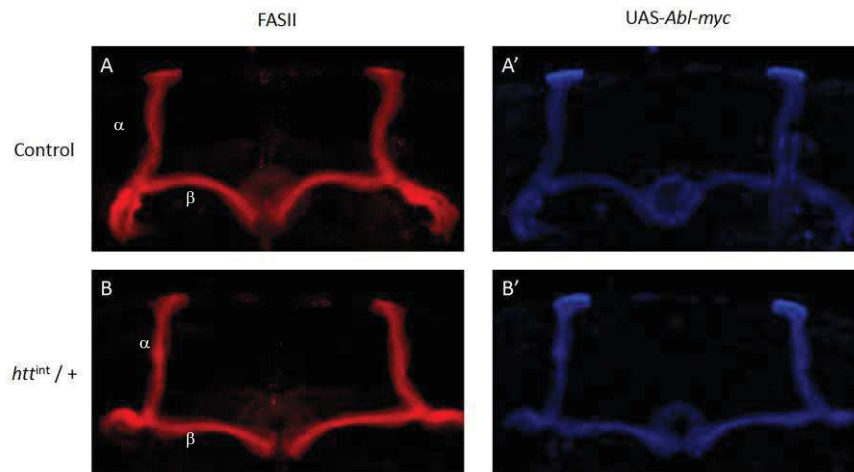
### 1.6 HTT régule l'activité d'*Abl*

Suite aux résultats génétiques obtenus, nous avons cherché à définir moléculairement si HTT pouvait réguler ABL. J'ai pu établir précédemment que l'activité kinase est essentielle à la fonction d'ABL dans les MB. En parallèle, la littérature nous informe que l'activité d'ABL est corrélée à son niveau de phosphorylation. Nous avons donc pensé à regarder l'état de phosphorylation d'ABL en fonction du niveau d'HTT. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Lee G. Fradkin (**Figure 42**).

Nous avons utilisé des cellules S2, dans lesquelles la construction génomique *Abl-GFP* a été transfectée. Après avoir immunoprécipité ABL-GFP, nous avons révélé le niveau de phosphorylation de la protéine avec un anticorps anti-phosphotyrosine.



**Figure 43 : La quantité de protéine ABL n'est pas modifiée par la perte de fonction d'*htt*.** (A-B) Expression de la construction Abl-GFP dans des cerveaux de pupes 48H en condition sauvage (A) et en condition mutant hétérozygote pour *htt<sup>int</sup>* (B) (A'-B') Visualisation des neurones  $\alpha/\beta$  avec FASII. (C) Quantification de l'expression de la GFP dans les MB. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 44 : Le transport d'ABL n'est pas modifié par la perte de fonction d'*htt*.** Expression de la construction UAS-Abl-myc dans les neurones  $\alpha/\beta$  avec *c739-GAL4* dans un cerveau adulte. (A-B) Visualisation des neurones  $\alpha/\beta$  avec FASII. (A'-B') Détection de la protéine ABL avec un anticorps anti-myc. Accumulation du marquage myc au niveau des extrémités des lobes  $\alpha$ .

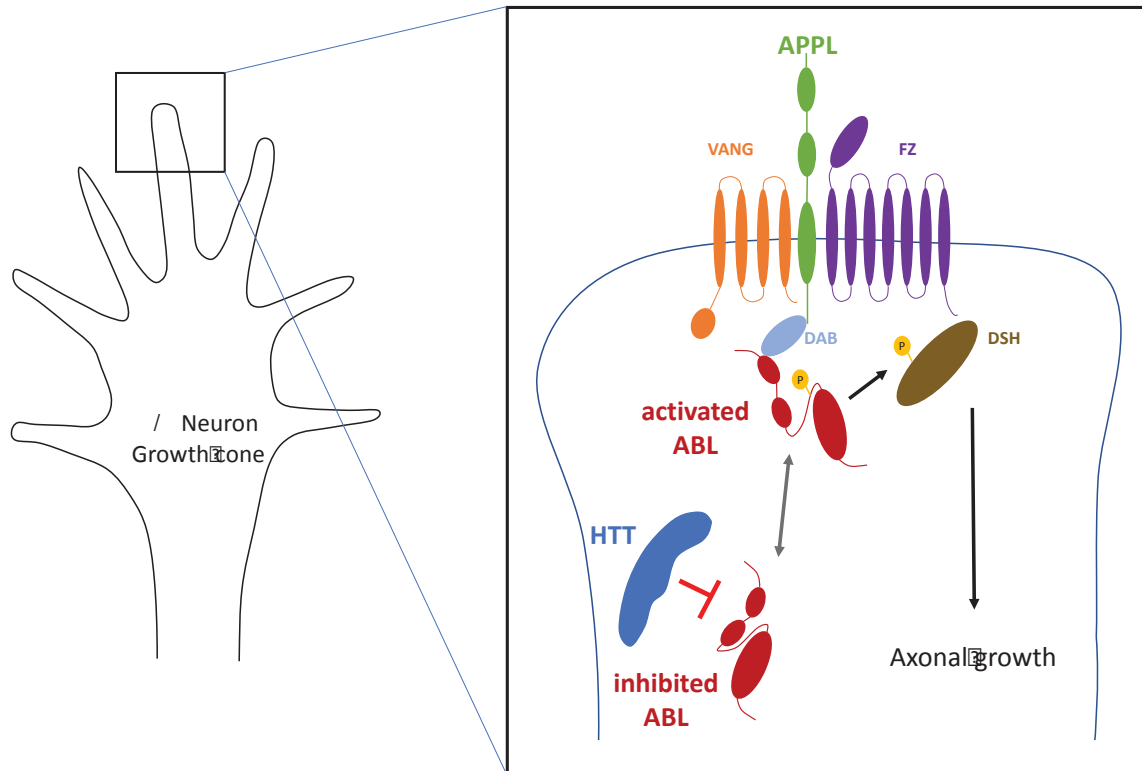
Nous pouvons voir que dans la condition où *htt* est réduit, le niveau de phosphorylation d'ABL est plus élevé que dans la condition contrôle. Ces résultats coïncident avec l'hypothèse qu'HTT régulerait négativement l'activité d'ABL.

### 1.7 HTT n'affecte ni la quantité, ni la localisation d'ABL

Après avoir montré en cellule S2 que le taux de phosphorylation d'ABL était augmenté lorsque HTT était absent, nous avons voulu nous assurer que cette augmentation de la phosphorylation n'était pas due à une augmentation du taux de la protéine en elle-même. J'ai donc quantifié *in vivo* l'expression de la construction *Abl-GFP* dans les MB au stade pupal 48H en condition sauvage et mutant hétérozygote pour *htt* (**Figure 43**). J'ai pu mettre en évidence que le mutant *htt* n'induisait pas d'augmentation significative de la quantité de la protéine dans les MB pendant le développement des MB.

Etant établi que l'une des fonctions majeurs d'HTT est le transport axonal, nous avons voulu vérifier si la localisation d'ABL pouvait être altérée chez le mutant *htt*. Pour cette expérience, j'ai utilisé une construction UAS-*Abl* marquée par un peptide *myc* (**Figure 44**). Dans la condition, l'expression de cet UAS avec *c739-GAL4* nous montre qu'ABL est distribuée tout le long des axones  $\alpha/\beta$ . Cependant on note une accumulation de la protéine à l'extrémité du lobe  $\alpha$ , ce qui tend à confirmer son importance pour le développement de cet axone comme les données génétiques l'avaient montrée précédemment. Chez le mutant *htt*, la distribution n'est pas affectée, et on conserve cette accumulation dans le lobe  $\alpha$ , ce qui démontre que la fonction d'HTT n'est pas de transporter ABL le long de l'axone.





**Figure 45 : Régulation de l'activité d'ABL au niveau du cône de croissance pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$  de MB.** Représentation schématique du modèle proposé. Au niveau du cône de croissance, ABL alterne entre un état activé via son recrutement/activation par les protéines APPL et DAB (*Disabled*), et un état inhibé via la protéine HTT. L'activation d'ABL lui permet de phosphoryler la protéine DSH et ainsi d'activer la voie PCP, permettant la croissance axonale. Toutefois, afin d'éviter une suractivité d'ABL néfaste pour le développement, cette dernière est régulée négativement par la protéine HTT.

## 1.8 Conclusion

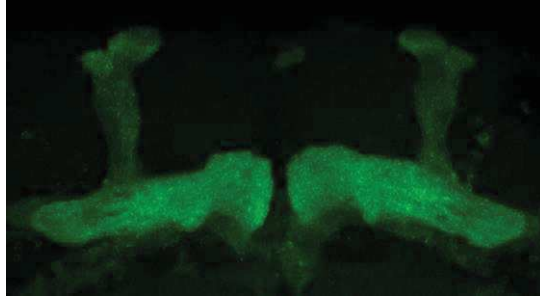
Nous avons vu que le mutant *App<sup>l</sup>* provoque des défauts de croissance des neurones  $\alpha/\beta$ , qui peuvent être sauvés lorsqu'on induit une perte de fonction partielle du gène *htt*. J'ai pu mettre en évidence que cette régulation de la croissance des neurones par *htt* passe par la voie PCP et plus particulièrement par le contrôle de l'activité de la kinase ABL. (**Figure 45**).

L'activité kinase de la protéine ABL est essentielle au développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Toutefois, cette activité nécessite une régulation fine et précise. J'ai en effet démontré que la diminution, tout comme l'augmentation de cette activité kinase peuvent être délétères pour le développement des neurones  $\alpha/\beta$ .

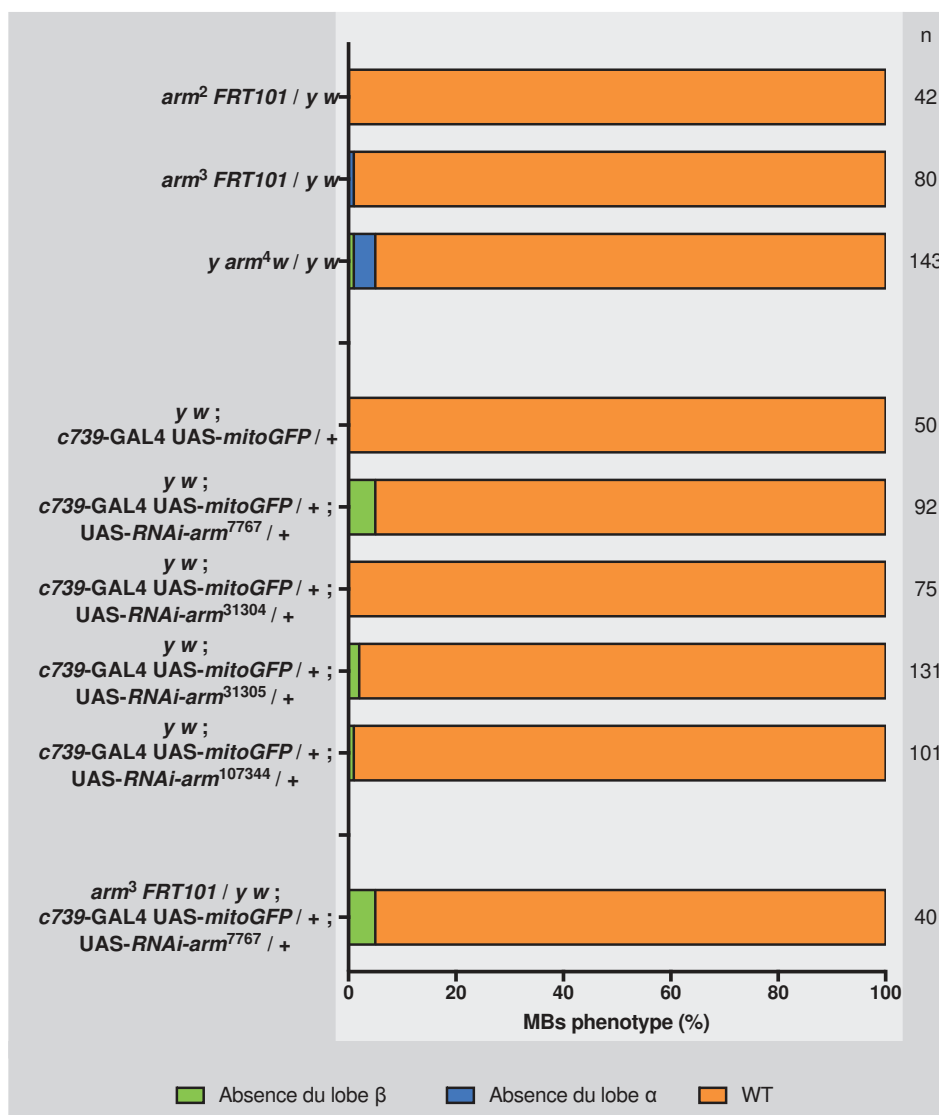
Nous proposons avec cette étude que la protéine HTT participerait à la régulation négative de l'activité kinase de la protéine ABL dans les neurones  $\alpha/\beta$  des MB.

Les interactions génétiques entre HTT et ABL démontre d'une part qu'en l'absence d'une activité kinase de la protéine ABL (*Abi<sup>2</sup> / Abi<sup>4</sup>*), la perte de fonction d'HTT ne permet pas de sauver la croissance des axones  $\beta$ . A l'inverse, le phénotype d'une combinaison mutant hypomorphe d'ABL (*Abi<sup>2</sup> / Abi<sup>1</sup>*) est significativement sauvé par la perte de fonction d'*htt*. D'autre part, j'ai pu démontrer que le phénotype mutant de surexpression d'ABL est lui aussi diminué lorsque la protéine HTT est surexprimée simultanément. Ceci démontre une interaction entre ces deux protéines pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$ .

Enfin, nous avons pu démontrer que cet effet d'HTT sur ABL passait directement par la régulation de son activité kinase, sans modifier ni l'expression de la protéine, ni son transport le long des axones  $\alpha/\beta$ .



**Figure 46 : Expression d'ARM dans les MB.** Visualisation de la GFP exprimée sous contrôle d'*arm*-GAL4 dans un cerveau adulte. On détecte la présence de la GFP dans les trois types de neurones des MB.



**Figure 47 :** La perte de fonction partielle d'ARM ne produit pas d'effet majeur sur le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. Les différents mutants *arm* et l'expression d'un ARNi dans les neurones  $\alpha/\beta$  n'induisent que de très faibles phénotypes. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

## **2. Collaboration entre *Appl* et *arm* via sa fonction dans les jonctions adhérentes pour le développement des neurones**

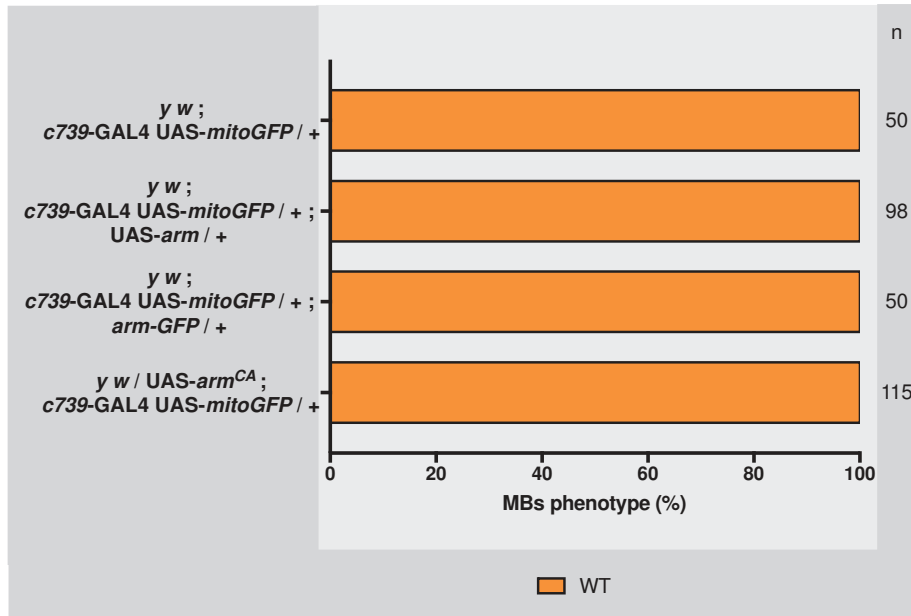
Toujours dans l'optique de trouver des interacteurs moléculaires à *Appl* dans la pousse des axones  $\beta$ , je me suis intéressée au début de ma thèse au gène *arm*. Ce gène code l'homologue de la  $\beta$ -caténine chez l'homme. Chez la drosophile, il a été établi que cette protéine ARM joue un rôle dans la voie d'adhésion cellulaire mais aussi dans la voie Wingless. En 2010, Singh *et al.* propose qu'il pourrait y avoir une interaction entre les voies PCP et Wnt/Wingless via la protéine ABL. Nous avons donc cherché à voir s'il existait une interaction génétique entre *arm* et *Appl* et plus largement avec la voie PCP au niveau des neurones  $\alpha/\beta$ .

Le gène *arm* se trouve sur le chromosome X. Nous travaillons avec trois allèles mutants, *arm*<sup>2</sup>, *arm*<sup>3</sup> et *arm*<sup>4</sup>, tous codant pour une forme tronquée de la protéine. Chacun de ces trois allèles est létal à l'état homozygote.

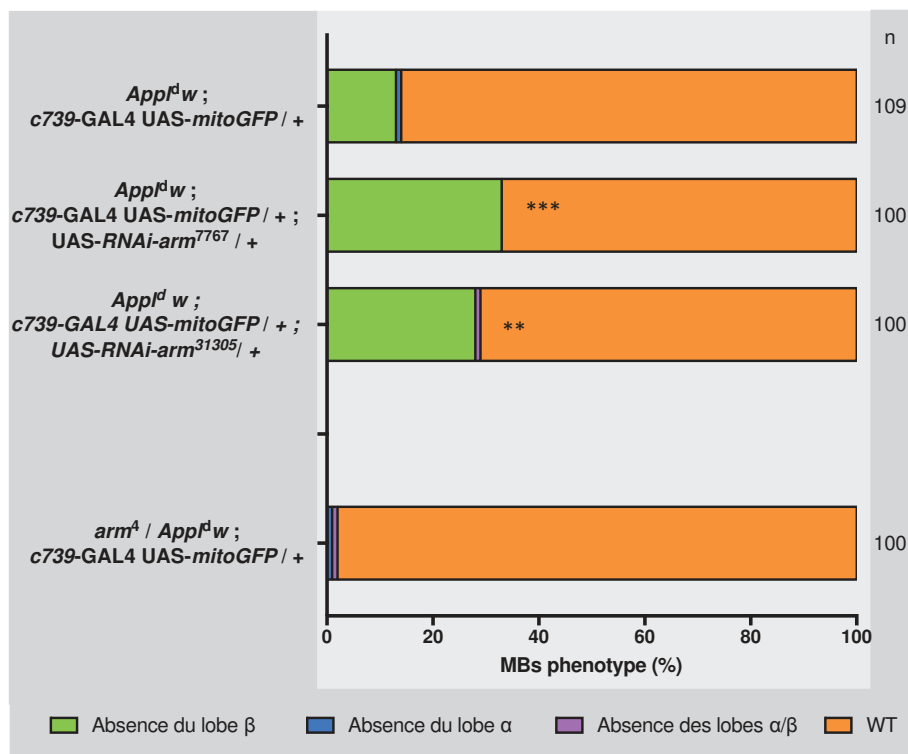
Avant tout, j'ai cherché à déterminer le pattern d'expression d'ARM dans le cerveau. Pour cela, j'ai exprimé une construction UAS-*mGFP* sous le contrôle d'une construction *arm*-GAL4, qui permet d'exprimer le GAL4 sous le contrôle du promoteur du gène *arm* (**Figure 46**). J'ai ainsi pu mettre en évidence qu'ARM est bien exprimée dans tous les neurones des MB.

### **2.1 Analyse du phénotype mutant et de la surexpression *arm***

Avant de présenter les résultats d'interaction génétique avec *Appl*, je me suis intéressée à l'effet intrinsèque d'*arm* sur le développement des MB (**Figure 47**). Etant létaux à l'état hémizygotique, j'ai regardé l'effet des différents mutants en femelle hétérozygote. Nous pouvons ainsi voir que seul l'allèle *arm*<sup>4</sup> semble produire un faible effet sur le développement du lobe  $\alpha$ .



**Figure 48 :** La surexpression d'ARM ne produit pas d'effet majeur sur le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. La surexpression d'*arm* grâce au système UAS-GAL4, ou à une construction génomique n'induit aucun changement dans le développement des MB. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 49 :** La perte de fonction partielle d'ARM augmente le phénotype mutant d'*App<sup>l</sup>* dans les MB. L'expression de constructions UAS-ARNi contre *arm* dans les neurones  $\alpha/\beta$  augmente le pourcentage de perte du lobe  $\beta$ . L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Afin de contourner le problème de la létalité de ces allèles mutants, j'ai utilisé différentes constructions ARNi contre *arm* que j'ai exprimées dans les MB à l'aide de *c739-GAL4*. Seule la construction *UAS-ARNi-arm<sup>7767</sup>* produit un effet sur le développement du lobe  $\beta$ , avec l'apparition de 5% de perte du lobe  $\beta$  (on pourrait s'attendre à un phénotype plus pénétrant en utilisant *OK107-GAL4*). J'ai ensuite reproduit cette expérience dans un contexte hétérozygote mutant pour *arm<sup>3</sup>*, afin de tenter d'augmenter la pénétrance de ce phénotype. Dans cette condition, on observe toujours une perte du lobe  $\beta$  d'environ 5% des MB.

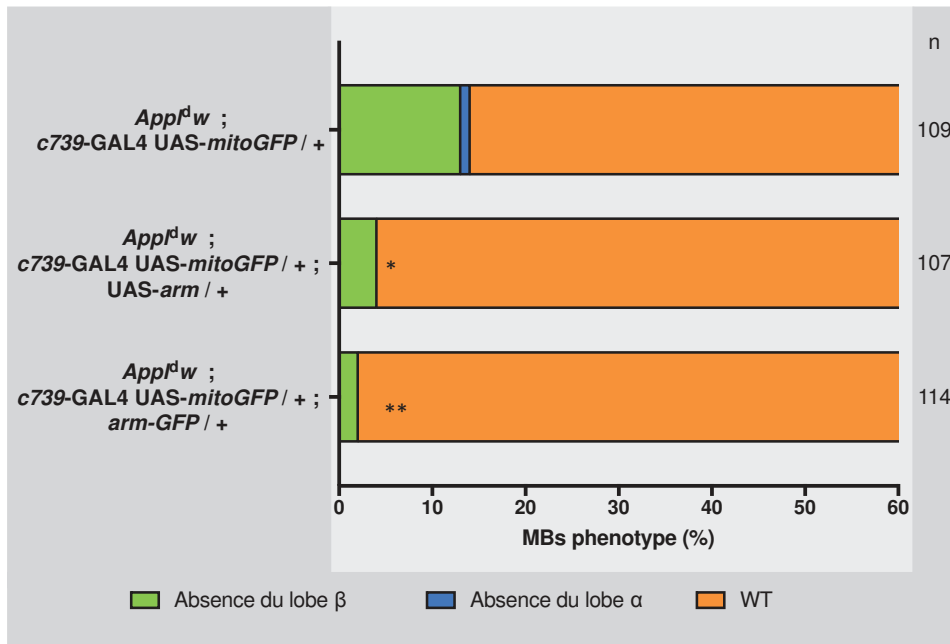
Suite à ces résultats, il semblerait qu'*arm* ne joue pas un rôle majeur dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Cependant il faut noter qu'on travaille en condition hétérozygote. Afin de voir le phénotype du mutant *arm*, nous sommes en train de construire des souches pour réaliser des clones MARCM canoniques.

En parallèle, j'ai analysé la surexpression d'*arm* dans les MB (**Figure 48**). Aucun phénotype n'est apparu lors du développement des MB, lorsque j'ai exprimé *arm* sous contrôle UAS ou grâce à une construction génomique. De la même façon, aucun phénotype n'est produit lorsque j'exprime une construction constitutivement active d'*arm* spécifiquement dans les neurones  $\alpha/\beta$ .

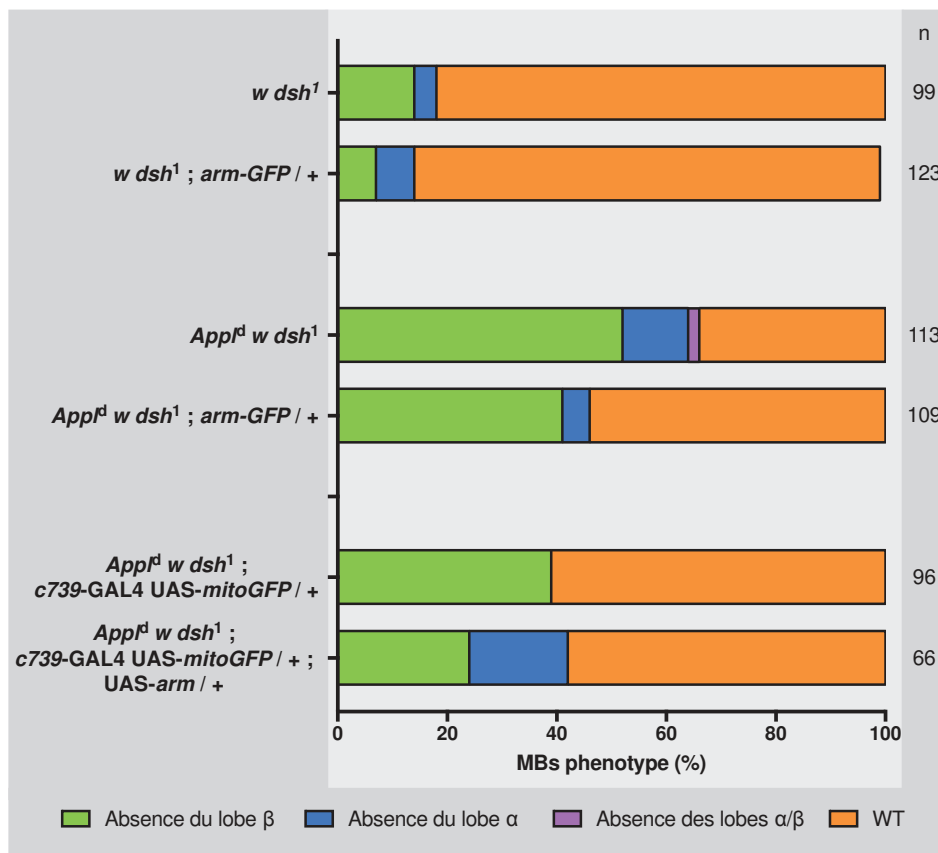
En résumé, la perte de fonction partielle d'*arm* produit un faible effet sur le développement des MB, alors que la surexpression ne semble pas avoir d'effet dans les MB.

## 2.2 Analyse de l'interaction génétique entre *Appl* et *arm*

Afin de mettre en évidence une interaction entre *Appl* et *arm*, j'ai observé l'effet de l'expression des constructions ARNi contre *arm* chez le mutant *Appl<sup>d</sup>* (**Figure 49**). Dans ces



**Figure 50 :** La surexpression d'ARM sauve le phénotype du mutant *AppI<sup>dw</sup>* dans les MB. La surexpression d'*arm* grâce au système UAS-GAL4, ou à une construction génomique diminuent significativement le phénotype de perte du lobe β. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β : \*\* p< 0,01, \* p< 0,05.



**Figure 51 :** La surexpression d'ARM ne sauve pas le phénotype mutant de *dsh<sup>1</sup>* et d'*AppI<sup>dw</sup> dsh<sup>1</sup>* dans les MB. La surexpression d'*arm* grâce au système UAS-GAL4, ou à une construction génomique ne modifie pas le phénotype de perte du lobe β des mutants *dsh<sup>1</sup>* et *AppI<sup>dw</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

conditions, on observe une augmentation significative du phénotype passant de 15% perte du lobe  $\beta$  du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* à 30%.

Le double hétérozygote *arm<sup>4</sup> / App<sup>l<sup>d</sup></sup>* est à 98% sauvage, ce qui signifie qu'une demi dose de chacun de ces gènes est suffisant pour permettre un développement normal des MB.

J'ai ensuite regardé l'effet de la surexpression d'*arm* chez un mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* (**Figure 50**). On observe un sauvetage significatif du phénotype de perte du lobe  $\beta$  lorsqu'*arm* est surexprimé dans les neurones  $\alpha/\beta$  grâce au système UAS-GAL4 ou alors grâce à une construction génomique.

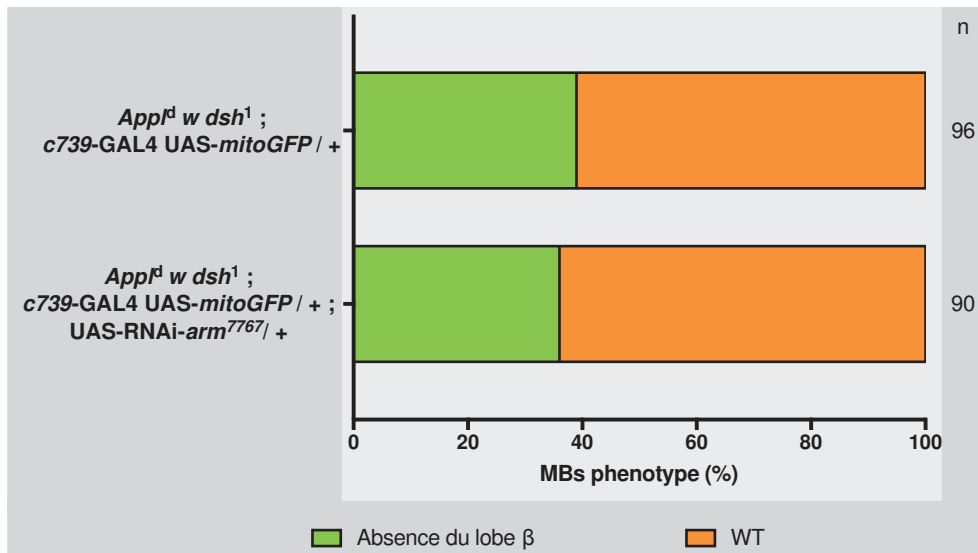
Pour résumer, une perte de fonction d'*arm* permet d'augmenter le phénotype mutant d'*App<sup>l<sup>d</sup></sup>* alors que le gain de fonction permet à l'inverse de le sauver. Cela démontre un effet synergique entre ces deux protéines lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ .

### 2.3 Analyse des interactions génétiques entre *arm* et les membres de la voie PCP

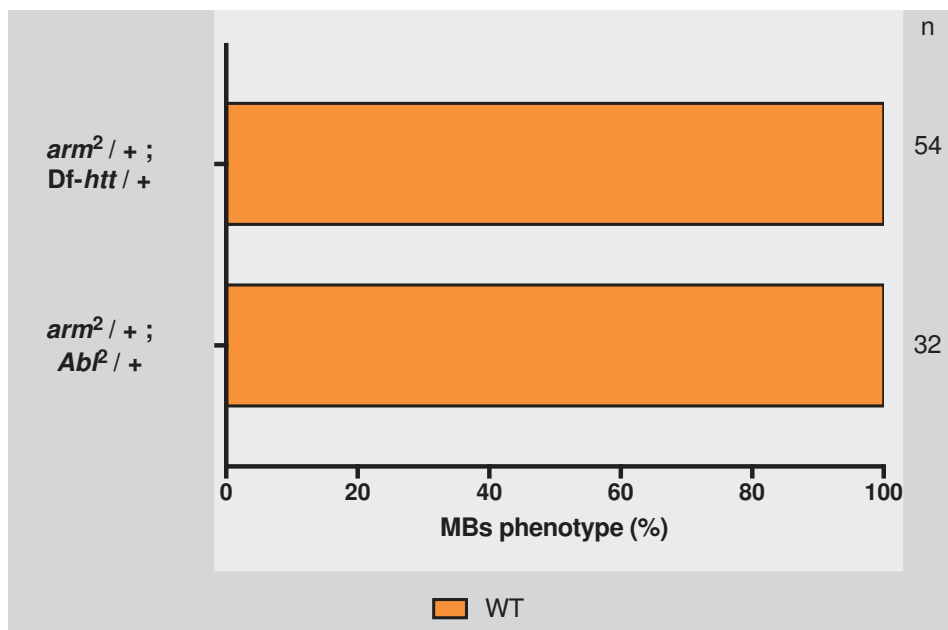
Ayant montré une interaction génétique entre *arm* et *App<sup>l</sup>*, je me suis intéressée à une possible interaction entre la voie PCP et ARM (**Figure 51**). Dans ce but, j'ai tenté de sauver le phénotype du mutant *dsh<sup>1</sup>* en surexprimant *arm* avec la construction génomique. Bien qu'on observe une diminution du phénotype, il n'y a pas de sauvetage significatif. Lorsque j'ai exprimé cette construction chez le double mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup> dsh<sup>1</sup>*, on observe de nouveau une diminution du phénotype mais non significative.

J'ai confirmé cette absence de sauvetage significatif en exprimant *arm* spécifiquement dans les MB chez le double mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup> dsh<sup>1</sup>*, bien qu'on détecte à nouveau une légère





**Figure 52 :** La perte de fonction partielle d'ARM ne modifie pas le phénotype mutant d'*App<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* dans les MB. L'expression d'un ARNi contre *arm* avec *c739-GAL4* ne modifie pas le phénotype de perte du lobe β du mutant *App<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 53 :** La protéine ARM n'interagirait ni avec HTT, ni avec ABL au niveau des neurones α/β des MB. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

diminution du phénotype de perte du lobe  $\beta$ .

J'ai ensuite essayé d'augmenter le phénotype du double mutant *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* en diminuant la quantité d'ARM (**Figure 52**). L'expression d'un ARNi contre *arm* dans les MB chez un mutant *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* ne modifie pas le phénotype de perte du lobe  $\beta$ .

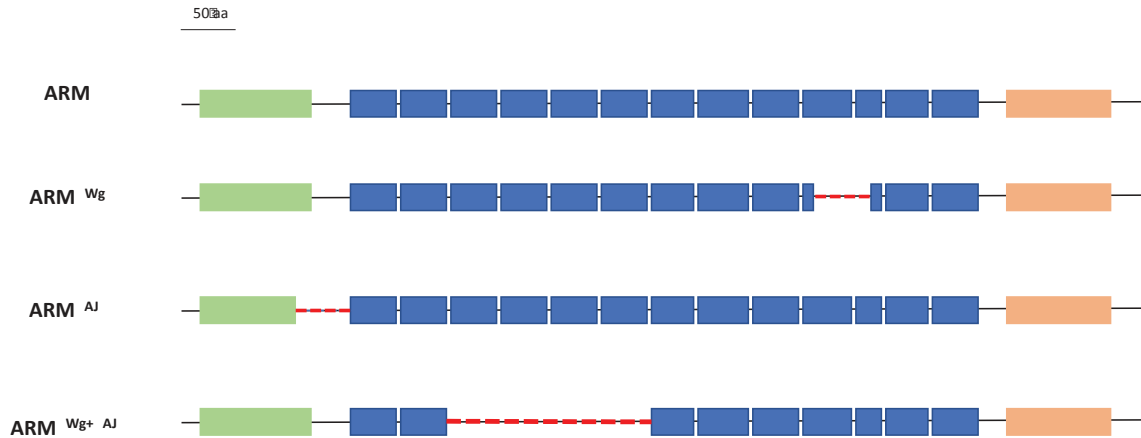
Ayant précédemment montré que les protéines ABL et HTT sont impliquées dans le voie PCP, j'ai ensuite observé l'effet du mutant hétérozygote *arm* associé soit à une mutation *htt*, soit à une mutation *Abl* (**Figure 53**). Dans les deux cas, aucun phénotype n'est apparu.

L'ensemble de ces résultats nous démontre que l'interaction observée entre *arm* et *Appl* n'est pas connectée à la fonction d'*Appl* la voie PCP. Cela invalide notre hypothèse de départ, qui était que les voies PCP et Wnt/Wingless pouvaient interagir ensemble pendant le développement via la protéine ABL.

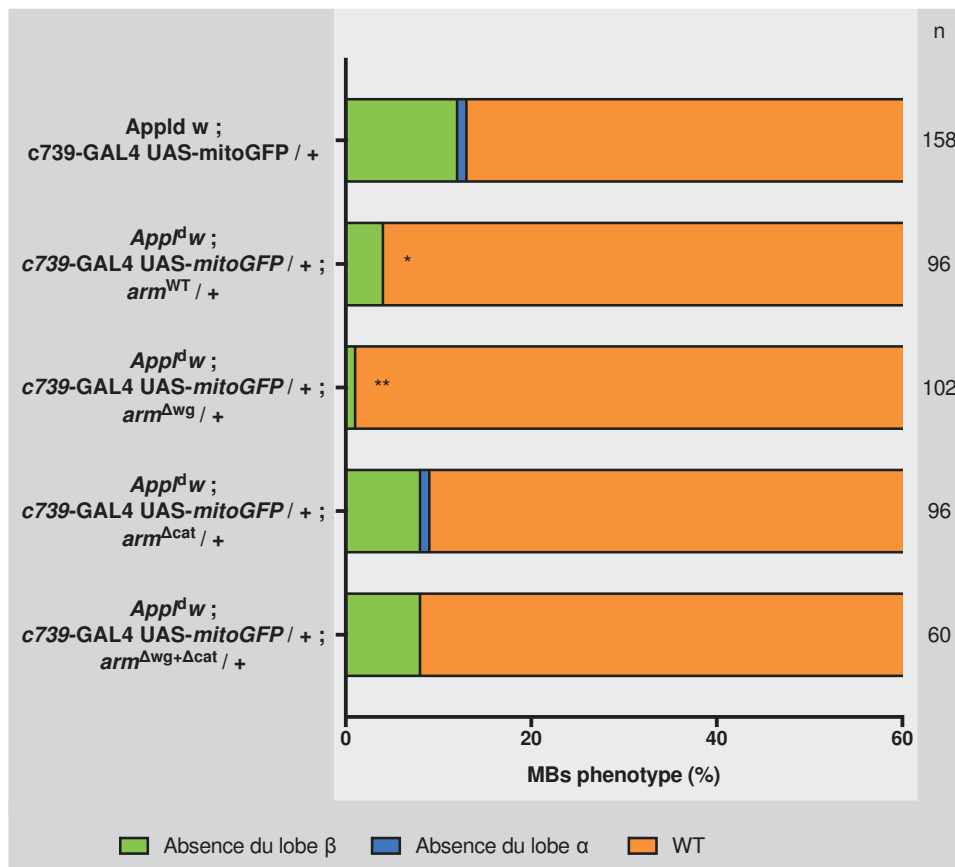
Suite à ces résultats, nous avons voulu déterminer si l'interaction entre *Appl* et *arm* passait via la fonction d'*arm* dans la voie Wnt/Wingless ou alors par la fonction d'*arm* dans les jonctions adhérentes (**Figure 18-19**).

#### 2.4 Analyse de l'expression de différentes formes *arm* dans les MBs

Afin de répondre à cette nouvelle question, nous avons utilisé différentes constructions génomiques mutées dans la séquence d'*arm*, et affectant l'une ou l'autre des fonctions d'*arm* (**Figure 54**). Nous disposons d'une construction sauvage (*arm<sup>WT</sup>*) que nous utilisons comme contrôle, une construction uniquement mutante pour la fonction d'ARM dans la voie Wingless (*arm<sup>Δwg</sup>*), une construction mutante uniquement pour la fonction d'ARM dans les jonctions adhérentes (*arm<sup>ΔAj</sup>*) et enfin une construction mutante pour les deux



**Figure 54 :** Représentation schématique des différentes formes de la protéine ARM produites à partir des constructions génomiques *arm*. La protéine ARM est composée de 13 répétitions de 42 acides aminés (rectangle bleu), d'une région N-terminale (rectangle vert), et C-terminale riche en glycine et proline (rectangle orange). La forme ARM<sup>ΔWg</sup> est dépourvu d'une partie des répétition 10 et 11. La forme ARM<sup>ΔAJ</sup> est dépourvu d'une partie de sa région N-terminale. La forme ARM<sup>ΔWg+ΔAJ</sup> est dépourvu des répétition 3 à 5. (Schéma inspiré de l'article de Orsulic *et al.* 1996)



**Figure 55 :** *App<sup>l</sup>* interagit avec la fonction d'*arm* dans les jonctions adhérentes. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

fonctions d'ARM ( $arm^{\Delta wg+\Delta Aj}$ ) (Orsulic *et al.* 1996).

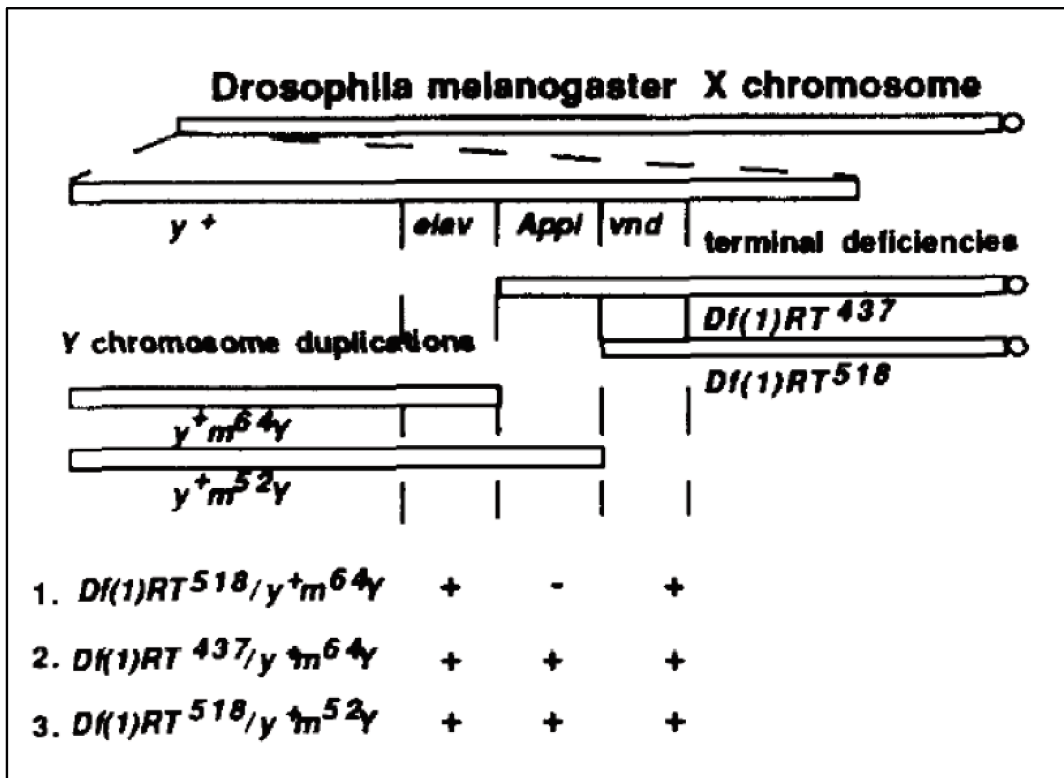
Chacune de ces constructions a ensuite été exprimée chez un mutant *Appl<sup>d</sup>* (**Figure 55**). Comme attendu, la construction  $arm^{WT}$  sauve de façon significatif la perte du lobe  $\beta$  du mutant *Appl<sup>d</sup>*. De façon surprenante, la forme mutante pour la voie Wingless  $arm^{\Delta wg}$  sauve aussi significativement le phénotype. A l'inverse les formes  $arm^{\Delta Aj}$  et  $arm^{\Delta wg+\Delta Aj}$  ne sauve pas le mutant *Appl<sup>d</sup>*. Ces résultats démontrent que l'interaction entre *Appl* et *arm* passe par la fonction dans la jonction adhérente de la protéine ARM. Cette interaction semble totalement indépendante de la voie Wnt/Wingless.

## 2.5 Conclusion

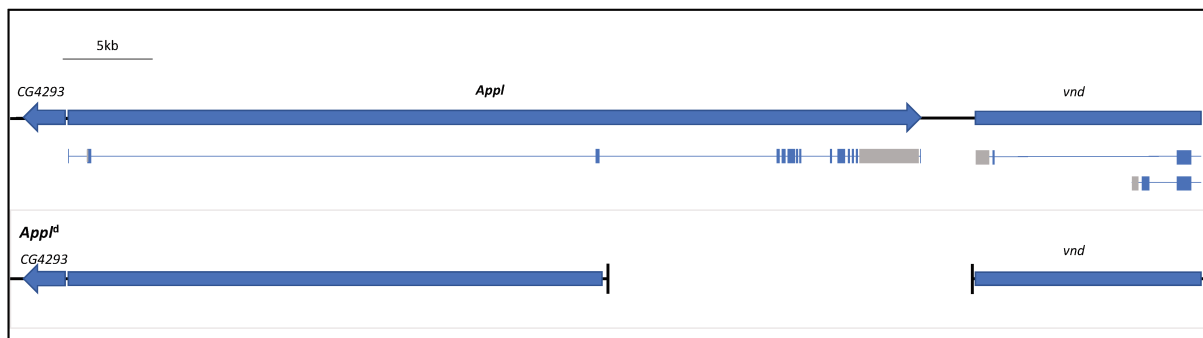
Nous avons observé une interaction génétique entre *Appl* et *arm* pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. Cependant, il ne semble pas y avoir d'interaction entre *arm* et les membres de la voie PCP.

Cela démontre qu'en plus d'être un co-récepteur de la voie PCP, APPL semble intervenir dans d'autres voies de signalisation durant le développement des MB.

La protéine ARM est impliquée dans deux voies de signalisation cellulaires majeures : la voie Wnt/Wingless et les jonctions adhérentes. Nous avons cherché à déterminer auprès desquelles de ces deux voies, la protéine APPL interagissait avec ARM. L'expression de construction ARM affectant l'une ou l'autre de ces voies nous a permis de mettre en évidence une interaction d'*Appl* avec la fonction d'*arm* dans les jonctions adhérentes.



**Figure 56 :** Représentation schématique du mutant  $Appl^d$ . L'allèle  $Appl^d$  résulte de l'association d'une délétion du chromosome X ( $Df(1)RT^{518}$ ) et d'une duplication du chromosome X sur le chromosome Y ( $y^+m^{64}Y$ ), permettant d'exciser  $Appl$  sans affecter les séquences d' $elav$  et  $vnd$ . Schéma issu de Luo *et al.*, 1992.



**Figure 57 :** Représentation schématique du mutant  $Appl^d$ . La séquence du haut représente le chromosome d'origine. La séquence du bas représente les limites du mutant  $Appl^d$ . Délimitation du mutant  $Appl^d$  par PCR. Il manque les 9 derniers exons, le codon stop et la région intergénique entre  $Appl$  et  $vnd$ .

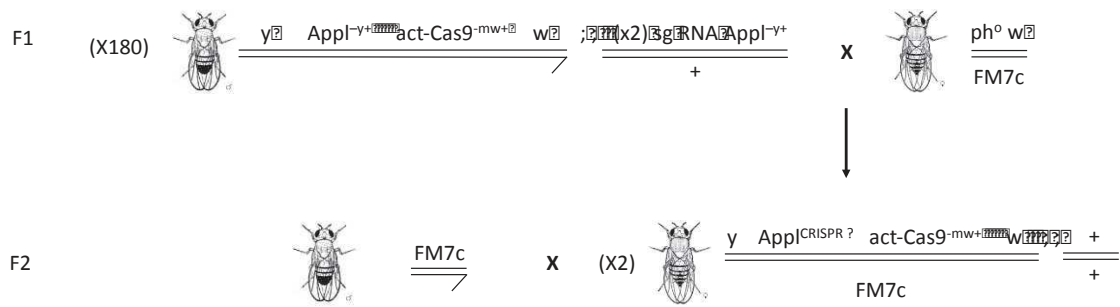
### 3. Création de nouveaux allèles mutants *App1* par la technique du CRISPR-Cas9

Le gène *App1* est porté par le chromosome X. Ce gène d'environ 50kb est entouré de deux gènes essentiels au développement : les gènes *elav* (*embryonic lethal abnormal vision*) et *vnd* (*ventral nervous system defective*). Au moment où j'ai commencé cette thèse, il n'existait qu'un seul allèle mutant pour ce gène, nommé *App1<sup>d</sup>*, créé par Luo *et al.*, 1992.

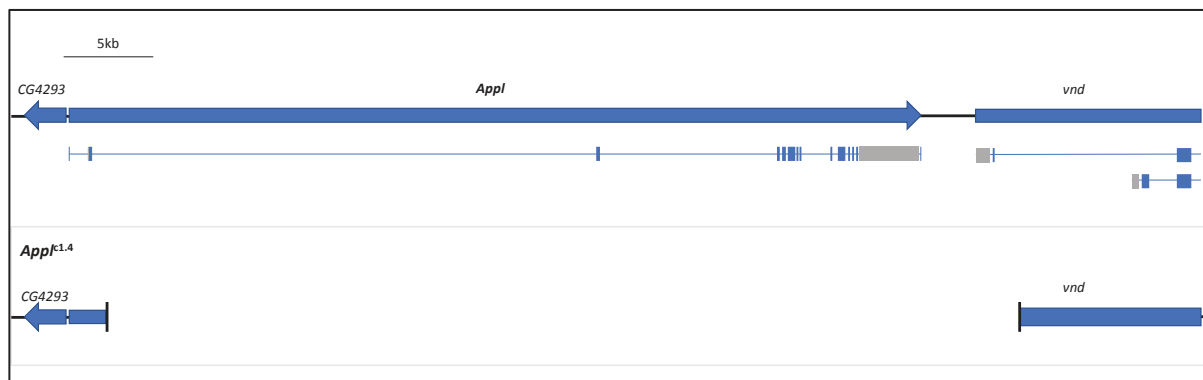
#### 3.1 Analyse moléculaire du mutant *App1<sup>d</sup>*

Afin d'étudier le rôle de ce gène, Luo *et al.* (1992) ont créé une délétion génomique de la région codant pour *App1*. Pour cela, ils ont utilisé une déficience du début du chromosome X comprenant les gènes *elav* et *App1*. Ils ont ensuite réalisé une translocation, par rayon gamma, d'une partie d'un chromosome Y comprenant une duplication du début du chromosome X s'arrêtant avant le gène *App1* (**Figure 56**). Des résultats scientifiques obtenus au laboratoire (communication personnelle de Jean-Maurice Dura) sont en accord avec la fusion du chromosome Y sur le chromosome X dans la mutation *App1<sup>d</sup>*, c'est à dire que les mâles sont *App1<sup>d</sup>-Y* et non *App1<sup>d</sup> / Y*. Ce mutant est décrit dans flybase comme étant une délétion de la partie centrale du gène, et dont les codons start et stop sont toujours présents.

Afin de délimiter précisément cette mutation, j'ai analysé par PCR l'ADN d'un mâle *App1<sup>d</sup>*. J'ai ainsi pu mettre en évidence que le codon start, le premier et le second exon sont toujours présents chez ce mutant. En revanche, la délétion s'arrête juste avant le début du gène *vnd*. Il manque les neuf derniers exons d'*App1*, le codon stop et la région intergénique entre *App1* et *vnd* (**Figure 57**).



**Figure 58 : Croisement effectué afin d'obtenir un mutant CRISPR.** Croisement individuel de 180 mâles exprimant l'allèle *Appl*<sup>Y+</sup>, la construction *act-Cas9* et les deux *sgRNA-Appl* avec des femelles balancer FM7c. Parmi la descendance F2, j'ai criblé pour des individus femelles *y*- signifiant la perte de l'allèle *Appl*<sup>Y+</sup>, à partir des quelles j'ai par la suite établi des souches.



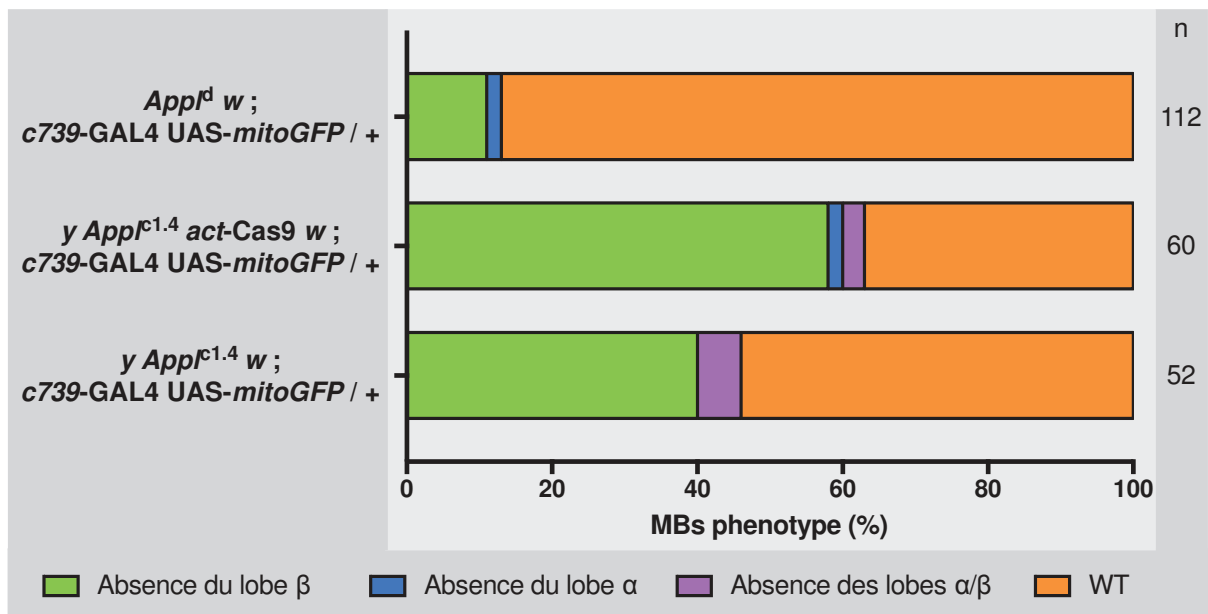
**Figure 59 : Représentation schématique du mutant *Appl*<sup>K1.4</sup>.** La séquence du haut représente le chromosome d'origine. La séquence du bas représente les limites du mutant *Appl*<sup>K1.4</sup>. Délimitation du mutant *Appl*<sup>d</sup> par PCR et séquençage. Il manque les 10 des 11 exons, le codon stop et la région intergénique entre *Appl* et *vnd* et le premier exon du transcrit B de *vnd*.

Afin de tenter de palier les différents problèmes phénotypiques rencontrés avec l'allèle *Appl<sup>d</sup>* (ces résultats sont détaillés dans la partie Résultats annexes), nous avons décidé de créer un nouvel allèle mutant pour le gène *Appl*. Pour cela, nous avons utilisé la technique de CRISPR-Cas9, qui permet de modifier une région précise du génome en créant des cassures doubles brins. Notre but étant d'obtenir un nul pour ce gène, nous avons décidé d'exciser la totalité de la séquence codante. Dans ce but, nous avons sélectionné deux séquences qui seront reconnues par les deux « synthetic guide RNA » (sg-RNA), l'un reconnaissant la région 5' du gène *Appl*, l'autre la région 3' du gène. Ces deux sg-RNA s'expriment de façon stable dans le génome.

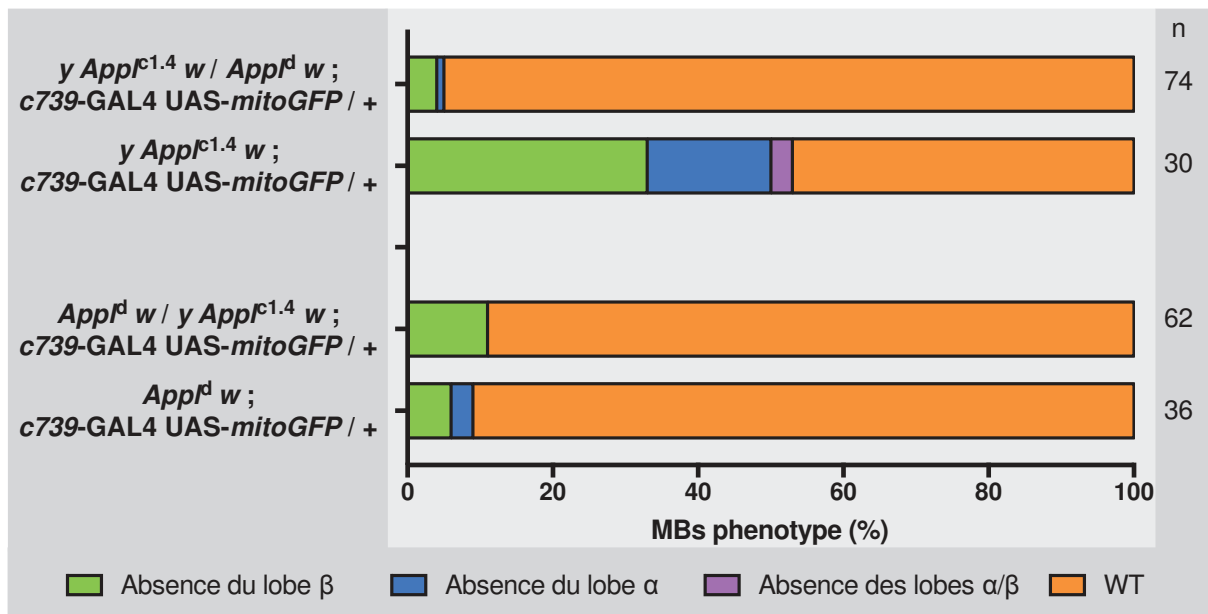
Conscients que l'excision de presque 50 kb ne serait pas aisée, nous avons voulu faciliter le criblage de ce nouveau mutant, en utilisant une lignée où le gène *Appl* est marquée par une construction *y<sup>+</sup>*. En suivant les conseils du Dr. Aymeric Chartier, nous sommes partis du principe que la perte du phénotype *y<sup>+</sup>* serait corrélée à la perte du gène *Appl*.

J'ai travaillé avec des individus mâles, exprimant simultanément l'allèle *Appl<sup>y<sup>+</sup></sup>*, le gène *Cas9* (s'exprimant sous le promoteur de l'actine), et la construction exprimant les deux sg-RNA-APPL (**Figure 58**). Chacun de ces mâles (n=180) a été croisé individuellement avec des femelles balancer du chromosome X. De ces 180 croisements, seuls deux d'entre eux ont pu fournir une descendance présentant les caractéristiques phénotypiques recherchées. Cela signifie que l'évènement désiré ne s'est produit que chez deux « pères » sur les 180 de départ, soit avec une probabilité de 1%. J'ai conservé un individu parmi chacune des deux descendances, afin d'établir deux souches à partir de chacun ces deux individus. Ces deux lignées seront notées *Appl<sup>c1.4</sup>* et *Appl<sup>c2.1</sup>*.





**Figure 60 :** Analyse du phénotype du mutant *App<sup>C1.4</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 61 :** Analyse du phénotype du mutant trans-hétérozygote *App<sup>d</sup> / App<sup>C1.4</sup>*. Les individus du haut du graphe sont issus du croisement de femelles *App<sup>C1.4</sup>* avec des mâles *App<sup>d</sup>*. Les individus du bas du graphe sont issus du croisement de femelles *App<sup>d</sup>* avec des mâles *App<sup>C1.4</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

### 3.2 Analyse du mutant *Appl*<sup>c1.4</sup>

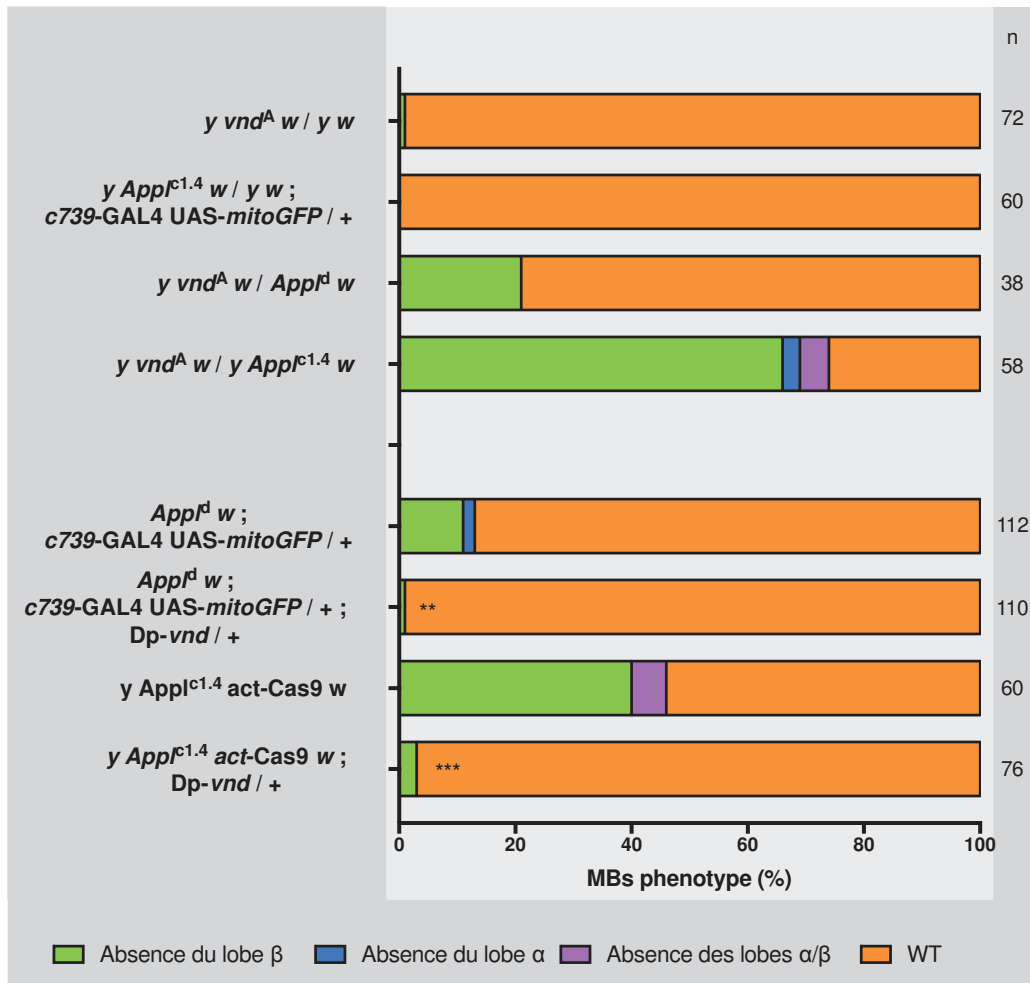
Après avoir délimité et séquencé ce mutant *Appl*<sup>c1.4</sup>, on peut voir que la délétion commence environ 1Kb après le sgRNA en 5' et se termine environ 6Kb après le sgRNA en 3' (**Figure 59**). Ce mutant enlève la presque totalité de la région codante d'*Appl*, à l'exception du premier exon, qui ne code que pour le peptide signal de la protéine. Cependant la mutation s'étend sur le gène *vnd*, situé juste après *Appl*, et enlève le codon start et le premier exon du transcrit B de *vnd*.

Le gène *vnd* code un facteur de transcription, initialement découvert pour avoir un rôle majeur dans le développement dans la corde nerveuse ventrale. Il a été établi que les mutants *vnd* sont létaux à l'état homozygote. Le fait que les mâles *Appl*<sup>c1.4</sup> soient viables nous laisse penser que la fonction de *vnd* pendant le développement du système nerveux n'est pas affectée.

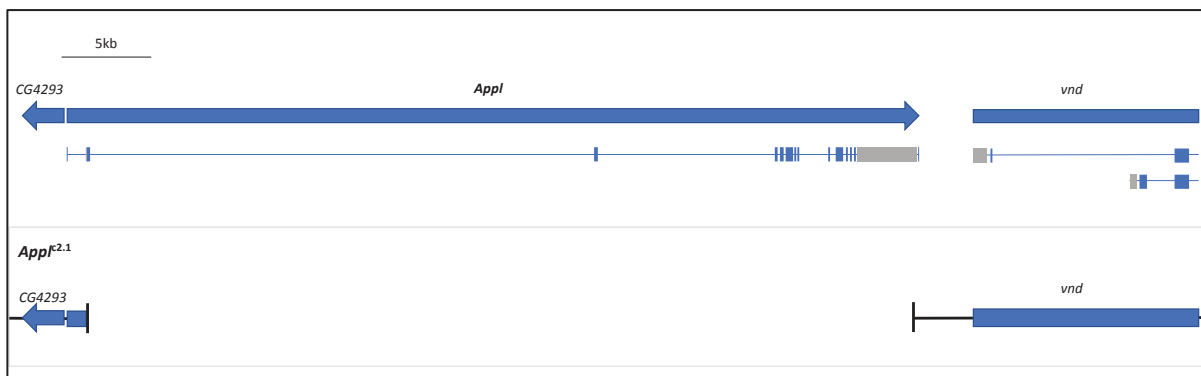
L'étude du phénotype des MB de ce mutant nous montre que la perte du lobe  $\beta$  est bien plus importante chez le mutant *Appl*<sup>c1.4</sup> (avec la Cas9 ou non) comparé au mutant *Appl*<sup>d</sup> (**Figure 60**). On observe une perte du lobe  $\beta$  dans 45 % et 60% des cas respectivement chez les individus *Appl*<sup>c1.4</sup> et *Appl*<sup>c1.4</sup> *act*-Cas9.

L'expression de *Cas9* semblant avoir un effet dans le phénotype, toutes les expériences faites par la suite pour analyser ce mutant se feront dans la mesure du possible avec la souche *Appl*<sup>c1.4</sup>, afin d'éviter tout effet non-désiré de *Cas9*.

Les femelles mutantes *Appl*<sup>c1.4</sup> / *Appl*<sup>d</sup> ne présentent qu'un très faible phénotype en comparaison des mâles *Appl*<sup>c1.4</sup> (**Figure 61**). Cela pourrait être dû à l'allèle *Appl*<sup>d</sup> lui-même



**Figure 62 :** Analyse de l'interaction génétique entre *App<sup>d</sup>* et *vnd*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 63 :** Représentation schématique du mutant *App<sup>K2.1</sup>*. La séquence du haut représente le chromosome d'origine. La séquence du bas représente les limites du mutant *App<sup>C1.4</sup>*. Délimitation du mutant *App<sup>d</sup>* par PCR et séquençage. Il manque la totalité des exons d'*App<sup>d</sup>*, ainsi que les codons start et stop.

puisque les femelles homozygotes pour cet allèle ne présentent aussi qu'un très faible phénotype (ces résultats sont détaillés dans la partie Résultats annexes).

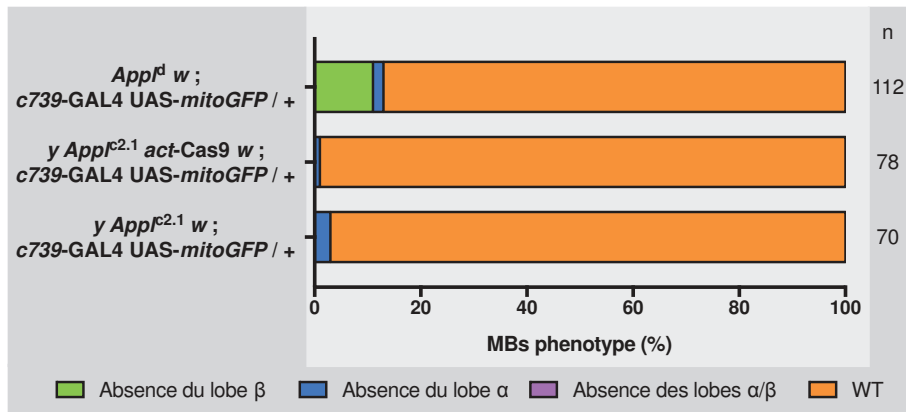
Lorsque je fais ce croisement dans le sens inverse, c'est à dire en croisant des femelles *AppI<sup>d</sup>* avec des mâles *AppI<sup>c1.4</sup>*, les femelles issues de ce croisement ont un phénotype d'environ 12%, similaire aux résultats obtenus avec des mâles *AppI<sup>d</sup>*.

Ce mutant affectant le gène *vnd*, j'ai analysé l'implication de cette mutation dans l'augmentation du phénotype. J'ai utilisé le mutant *vnd<sup>A</sup>* qui résulte de la mutation d'un nucléotide dans le gène, altérant l'épissage des transcrits. Cette mutation est létale à l'état homozygote. Cette létalité est sauvée par une duplication de *vnd*.

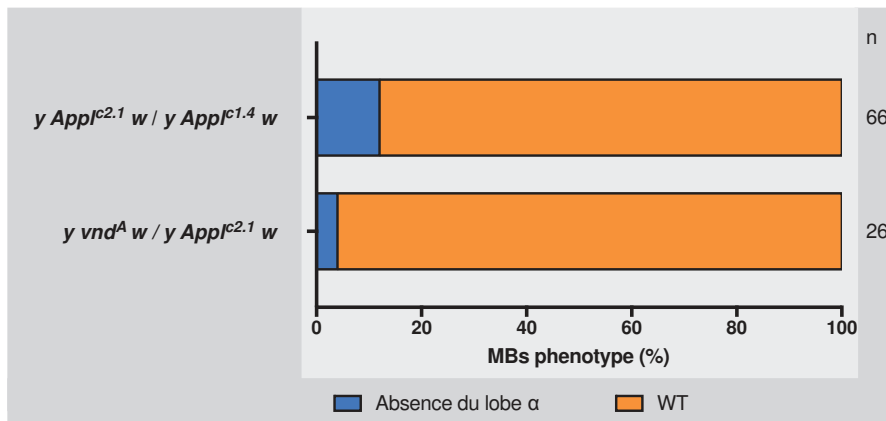
Les femelles hétérozygotes *vnd<sup>A</sup>* ne présentent pas de phénotype dans les MB. A l'inverse, les femelles doubles hétérozygotes *vnd<sup>A</sup> / AppI<sup>d</sup>* montrent un phénotype de 21% de perte du lobe  $\beta$ . De la même façon, les femelles doubles hétérozygotes *vnd<sup>A</sup> / AppI<sup>c1.4</sup>* ont un phénotype de 70% de perte du lobe  $\beta$ . Ces résultats laissent supposer une interaction génétique entre ces gènes pour la pousse du lobe  $\beta$  dans les neurones  $\alpha/\beta$  des MB (**Figure 62**).

J'ai ensuite exprimé une duplication de *vnd* (mais aussi d'une partie d'*AppI*) (**Figure 66**) afin de voir si la surexpression de *vnd* pouvait sauver les mutants *AppI*. Cette duplication sauve de façon significative les deux mutants *AppI<sup>d</sup>* et *AppI<sup>c1.4</sup>*. Nous sommes en train de tester par qRT-PCR si cette duplication de *vnd* restaure la transcription de la partie correspondante d'*AppI*, ce qui serait surprenant mais pas impossible.

Ces résultats peuvent laisser penser que *vnd* pourrait aussi être impliqué dans la croissance des neurones  $\alpha/\beta$  des MB.



**Figure 64 :** Analyse du phénotype du mutant *App<sup>c2.1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 65 :** Analyse du phénotype du mutant trans-hétérozygote *App<sup>c2.1</sup> / App<sup>c1.4</sup>* et *App<sup>c2.1</sup> / vnd<sup>A</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

### 3.3 Analyse du mutant *Appl*<sup>c2.1</sup>

Après avoir délimité et séquencé ce second mutant, on peut voir que cette fois ci, la mutation commence et se termine exactement au niveau des deux sg-RNA. Toute la séquence codante du gène a été éliminée (**Figure 63**), sans altérer cette fois ci la région intergénique entre *Appl* et *vnd*.

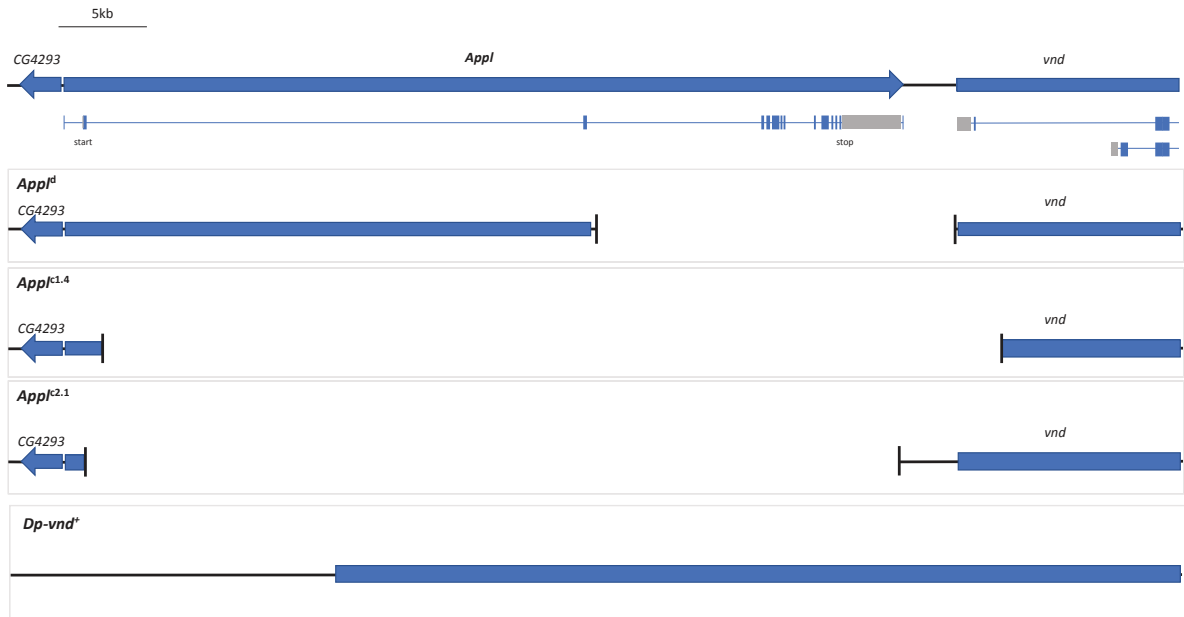
L'analyse du phénotype ne montre cependant aucun phénotype. En effet, les mâles *Appl*<sup>c2.1</sup> associé ou non au gène *Cas9* ne montrent aucun défaut au niveau du développement du lobe  $\beta$ . On observe un effet très faible sur le développement du lobe  $\alpha$  (**Figure 64**).

Ces résultats surprenant nous ont poussé à regarder l'effet des mutants trans-hétérozygotes *Appl*<sup>c1.4</sup> / *Appl*<sup>c2.1</sup> (**Figure 65**). Aucun effet sur le lobe  $\beta$  n'est apparu, mais 10% des MB présentaient une perte du lobe  $\alpha$ .

### 3.4 Conclusion

L'analyse moléculaire de l'allèle mutant *Appl*<sup>d</sup> nous a permis de déterminer que contrairement à ce qui est décrit dans flybase, le codon stop est absent. De plus, avec cet allèle la région intergénique entre *Appl* et *vnd* est absente.

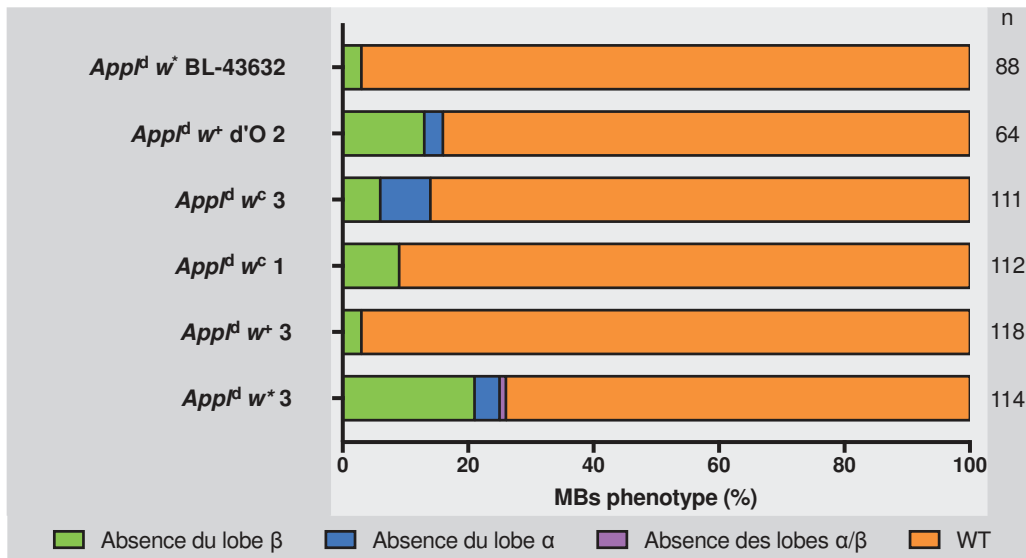
Afin de réaliser un nul propre du gène *Appl*, nous avons utilisé la technique du CRISPR-CAS9. Grâce à cette technique, nous avons créé deux nouveaux allèles mutants : *Appl*<sup>c1.4</sup> /et *Appl*<sup>c2.1</sup> (**Figure 66**). Alors que le mutant *Appl*<sup>c1.4</sup>, qui affecte aussi le gène voisin *vnd*, présente un phénotype mutant important (40% de perte du lobe  $\beta$ ) au niveau du développement des



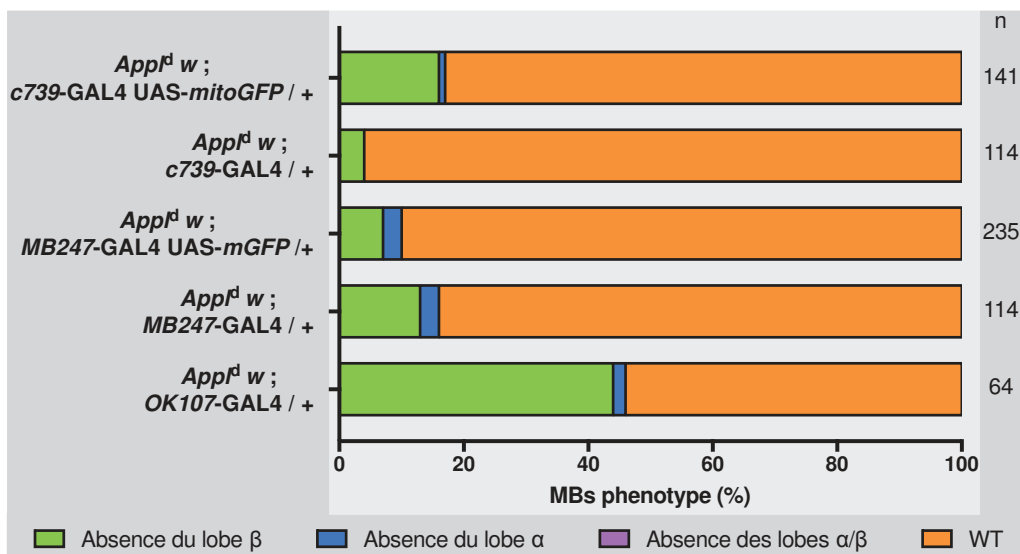
**Figure 66 :** Représentation schématique des différents allèles mutants déjà existants et obtenus : *Appl*<sup>d</sup>, *Appl*<sup>c1.4</sup>, *Appl*<sup>c2.1</sup> et de la duplication de *vnd*.

neurones  $\alpha/\beta$ , le mutant *Appl*<sup>c2.1</sup>, qui est restreint à *Appl*, ne produit aucun phénotype au niveau des MB. Cette absence de phénotype mutant avec l'allèle *Appl*<sup>c2.1</sup> suggère que le gène *vnd* puisse lui aussi avoir un rôle dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. Il est possible que le phénotype observé chez les mutants *Appl*<sup>d</sup> et *Appl*<sup>c1.4</sup> soit dû aux doubles mutations des gènes *Appl* et *vnd*. Ainsi la mutation *Appl*<sup>c2.1</sup> seule ne peut pas avoir d'effet sur le développement des MB. Cela signifierait que chez le mutant *Appl*<sup>d</sup>, bien que le gène *vnd* ne soit pas muté au sens strict, son expression est affectée par la mutation. En effet, les tests de complémentation entre *Appl*<sup>d</sup> / *vnd*<sup>A</sup> et *Appl*<sup>c1.4</sup> / *vnd*<sup>A</sup> montrent clairement que la fonction de *vnd* est touchée dans les deux mutations.





**Figure 67 : Analyse de la variabilité du phénotype mutant de l'allèle *AppI<sup>d</sup>* suivant le background.** La souche *AppI<sup>d</sup> w* BL-43632 provient de Bloomington. La souche *AppI<sup>d</sup> w<sup>+</sup> d'O2* vient d'un out-cross de la souche *AppI<sup>d</sup>*. Les souches *AppI<sup>d</sup> w<sup>c</sup> 1* et 3 viennent d'un out-cross de la souche *AppI<sup>d</sup>* avec la souche *y w<sup>c</sup>* (canton S). La souche *AppI<sup>d</sup> w<sup>+</sup> 2* vient d'un out-cross de la souche *AppI<sup>d</sup> w<sup>\*</sup>*. La souche *AppI<sup>d</sup> w<sup>\*</sup> 3* vient d'un out-cross de la souche *AppI<sup>d</sup> w<sup>\*</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 68 : Analyse de la variabilité du phénotype mutant de l'allèle *AppI<sup>d</sup>* après association avec différentes construction GAL4 et/ou UAS-GFP.** L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

## 4. Résultats supplémentaires

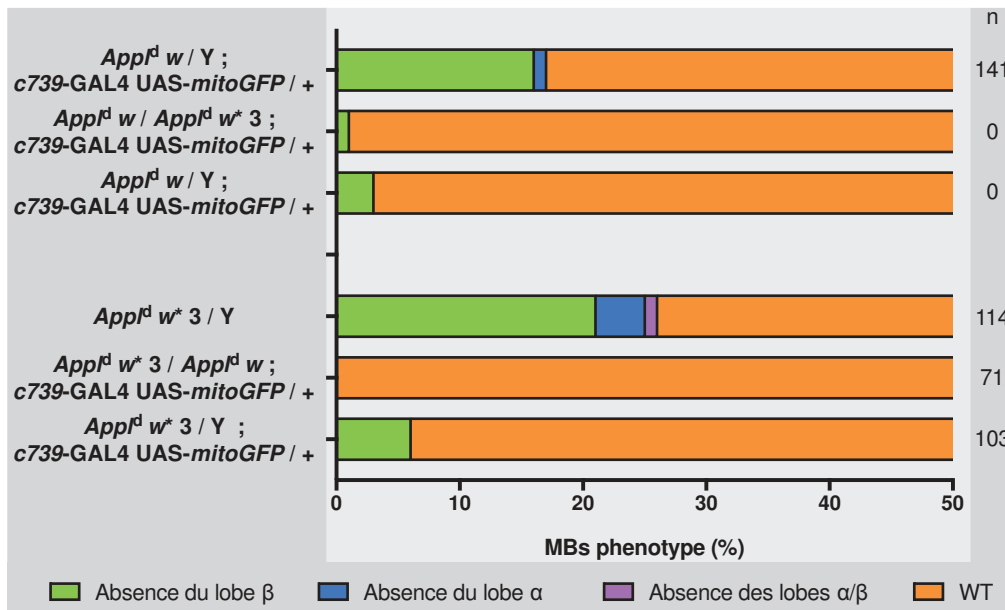
### 4.1 Le gène *App1*

#### 4.1.1 Analyse du phénotype du mutant *App1<sup>d</sup>* dans les MB

L'implication de la protéine APPL dans la pousse du lobe  $\beta$  pendant le développement des MB a été établie par Soldano *et al.* (2013). Cependant, dès le début de ma thèse nous avons réalisé que le background génétique de l'allèle *App1<sup>d</sup>* pouvait altérer la pénétrance de ce phénotype mutant. Il m'a fallu commencer par déterminer les lignées mutantes *App1<sup>d</sup>* avec un phénotype exploitable.

J'ai donc comparé le phénotype de différentes lignées, toutes mutantes pour *App1<sup>d</sup>*, mais chacune avec un background génétique différent (**Figure 67**). J'ai pu établir que la lignée *App1<sup>d</sup> w<sup>\*</sup> 3* était celle avec un phénotype de perte du lobe  $\beta$  le plus pénétrant (20% des MB). Cependant, six mois plus tard, le phénotype de cette même lignée n'était plus que de 2% de perte du lobe  $\beta$ . Ces résultats ont confirmé la sensibilité du phénotype face au bruit de fond « background » génétique, mais aussi mis en avant un problème dans la stabilité et la maintenance du phénotype au cours du temps.

J'ai ensuite étudié le phénotype de différentes lignées où la mutation *App1<sup>d</sup>* a été associée à différentes constructions GAL4 et UAS-*GFP* (**Figure 68**). Durant cette thèse j'ai utilisé majoritairement trois différents GAL4 : *c739*, *MB247* et *OK107*. Bien que tous trois soient spécifiques des MB, ils s'expriment dans des sous-populations neuronales différentes. Ainsi, *OK107* s'exprimera dans les trois catégories de neurones ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  et  $\gamma$ ), *MB247* s'exprime dans les neurones  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  et *c739* ne s'exprime que dans les neurones  $\alpha/\beta$  (Aso *et al.* 2008). Les GAL4 s'expriment avec une force différente dans les MB: *OK107*>*c739*>*MB247*.



**Figure 69 :** Analyse de la variabilité du phénotype mutant de l'allèle *Appl<sup>d</sup>* en condition homozygote ou hémizyote. La première barre du panel du haut correspond à la descendance male issu du croisement de femelle *Appl<sup>d</sup> w* avec des mâles *y<sup>w</sup>(CS)*. Le reste du panel du haut correspond à la descendance issu d'un croisement à partir de femelle *Appl<sup>d</sup> w* avec des mâles *Appl<sup>d</sup> w\* 3*. La première barre du panel du bas correspond à la descendance male issu du croisement de femelle *Appl<sup>d</sup> w\* 3* avec des mâles *y<sup>w</sup>(CS)*. Le reste du panel du bas correspond à la descendance issu d'un croisement à partir de femelle *Appl<sup>d</sup> w\* 3* avec des mâles *Appl<sup>d</sup> w*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

Clone		WT	lobeβabsence	lobeαabsence	/ lobeαabsence	n clone	n MB
WT	NB	100%	0%	0%	0%	43	146
	2/1cellules	100%	0%	0%	0%	8	212
<i>Appl<sup>d</sup></i>	NB	100%	0%	0%	0%	61	272
	2/1cellules	100%	0%	0%	0%	13	160

**Figure 70 :** Clones MARCM d'*Appl<sup>d</sup>*. Les clones neuroblastes ont été induits en L1 suite à un choc thermique d'une heure à 37°C. Les clones d'une à deux cellules ont été induits en pupes 48H suite à choc thermique de 5 min à 37°C. NB=Neuroblaste. n clone= nombre de clones observés. n MB = nombre de MB observés.

Clone		WT	lobeβabsence	lobeαabsence	/ lobeαabsence	n=	n MB
WT	NB	100%	0%	0%	0%	21	108
	2/1cellules	100%	0%	0%	0%	6	336
<i>Appl<sup>d</sup></i>	NB	94%	0%	6%	0%	17	110
	2/1cellules	0	0%	0%	0%	0	92

**Figure 71 :** Clones MARCM de visualisation d'*Appl<sup>d</sup>*. Les clones neuroblastes ont été induits en L1 suite à un choc thermique d'une heure à 37°C. Les clones d'une à deux cellules ont été induits en pupes 48H suite à choc thermique de 10 min à 37°C. NB=Neuroblaste. n clone= nombre de clones observés. n MB = nombre de MB observés.

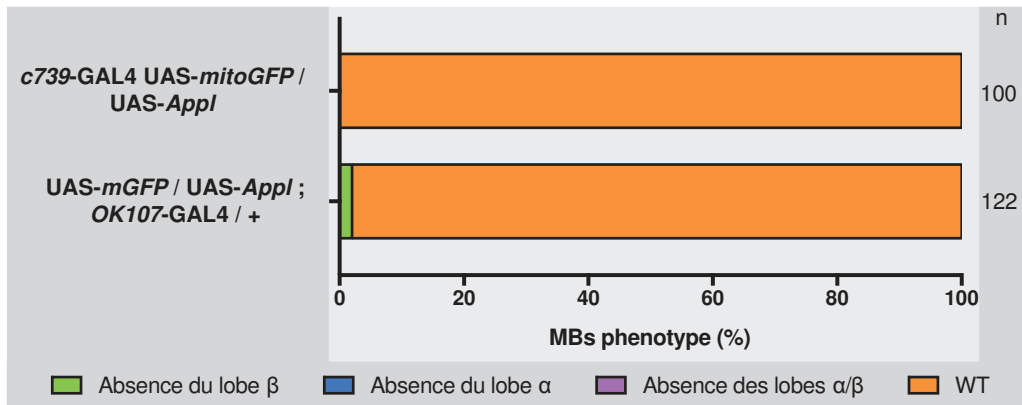
On peut voir que les lignées *App<sup>l</sup>d w<sup>\*</sup>* ; *c739-GAL4 UAS-mito-GFP / CyO<sup>GFP</sup>* et *App<sup>l</sup>d w<sup>\*</sup>* ; *MB247-GAL4* présentent un phénotype de perte du lobe  $\beta$  d'environ 15% comme attendu. Jusqu'à maintenant, le phénotype de ces deux lignées s'est maintenu dans le temps. On peut aussi voir que la souche *App<sup>l</sup>d w<sup>\*</sup>* ; *OK107-GAL4* montre un phénotype de 45% de perte du lobe  $\beta$ . Ce fort phénotype est probablement dû au GAL4 en lui-même. En effet, la construction *OK107-GAL4* est insérée dans le gène *ey (eyeless)*, qui a un rôle dans le développement des MB. Au vu des fortes variations de phénotype du mutant *App<sup>l</sup>d*, des croisements contrôles doivent être effectués en parallèle de chaque expérience d'interaction génétique.

#### 4.1.2 Différence de pénétrance du phénotype entre mâle et femelle

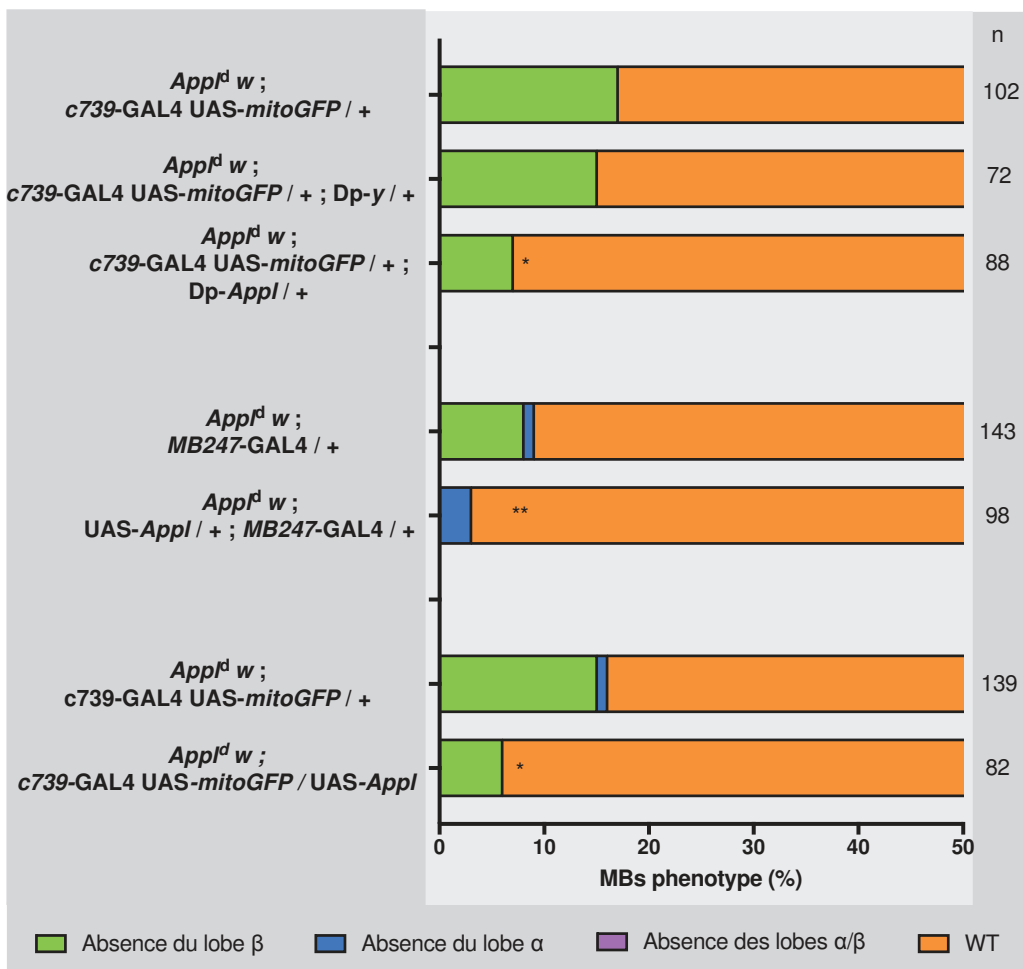
La complexité du mutant *App<sup>l</sup>d* se traduit également au niveau de l'étude de l'homozygotie (**Figure 69**). On peut voir que lorsque des femelles *App<sup>l</sup>d* sont croisées avec des mâles sauvages, 15% de la descendance mâle mutante pour *App<sup>l</sup>* présente un phénotype de perte du lobe  $\beta$ . On obtient les mêmes résultats avec les souches *App<sup>l</sup>d w<sup>\*</sup>* ; *c739-GAL4 UAS-mito-GFP / CyO<sup>GFP</sup>* ou *App<sup>l</sup>d w<sup>\*</sup>* 3. Cependant, dès qu'on croise ces deux souches l'une avec l'autre (et cela dans un sens comme dans l'autre), le phénotype des femelles homozygotes ou des hémizygotés est fortement réduit, voir nul. Cette absence de phénotype pourrait être dû à la nature complexe du mutant en lui-même.

#### 4.1.3 Clones MARCM canoniques et de visualisation

En commençant ma thèse, j'ai essayé d'obtenir des clones MARCM canonique du mutant *App<sup>l</sup>d*, qui nous permettent de visualiser un neurone mutant unique dans un contexte sauvage pour la mutation. Cependant, je n'ai pas réussi à obtenir un seul clone avec un



**Figure 72 :** Analyse de la surexpression d'*AppI<sup>d</sup>* dans les neurones α/β. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 73 :** Analyse du sauvetage du mutant *AppI<sup>d</sup>* avec différents GAL4. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β: \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

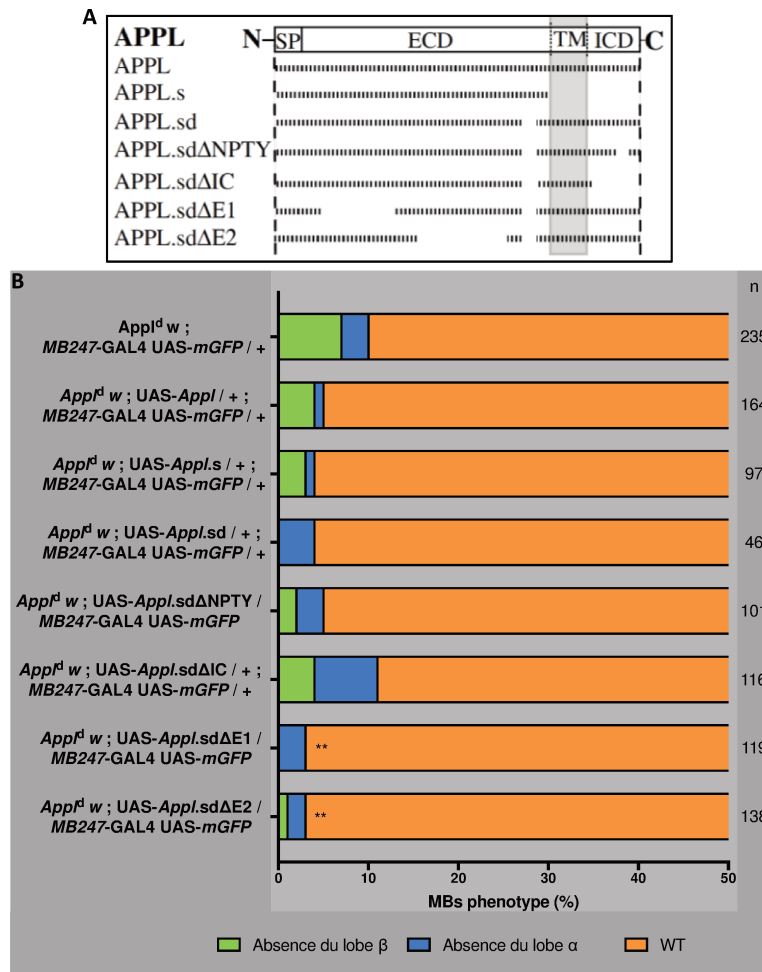
phénotype mutant (neuroblaste ou cellulaire) (**Figure 70**), ce qui pourrait s'expliquer par le faible phénotype observé en femelle homozygote mutante. Les conditions pour avoir un clone MARCM canonique n'étant pas favorables, j'ai essayé d'obtenir un clone MARCM de visualisation (visualiser un neurone unique mutant dans un contexte mutant). Bien qu'en clone neuroblaste (visualisation des neurones dérivant d'un même neuroblaste), on peut voir un phénotype de 6% de perte du lobe  $\beta$ , je n'ai pas réussi à obtenir de clone d'un neurone. Cela est sûrement dû à l'activité non adéquate de la Flipase dans cette condition (**Figure 71**).

#### 4.1.4 Analyse de la surexpression d'*App1* dans les MB

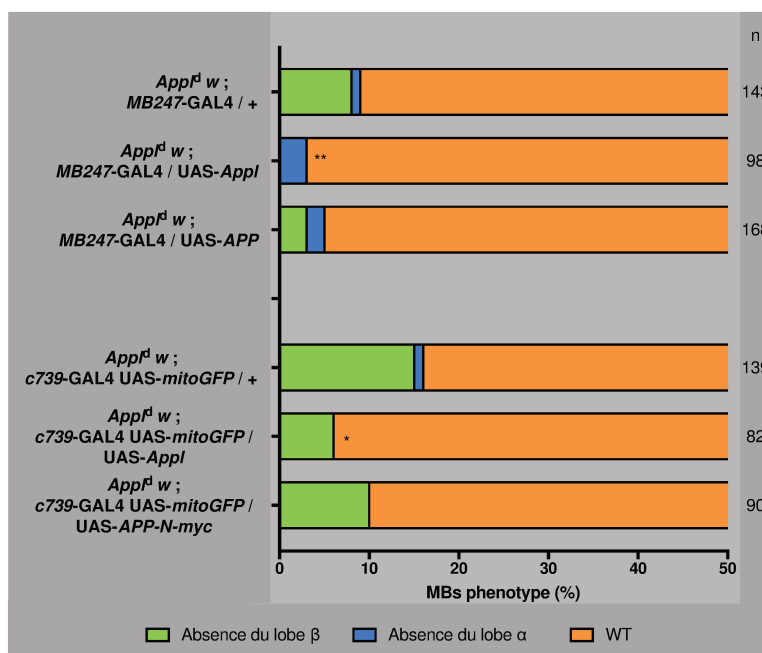
Puisque la perte d'*App1* provoque un défaut dans le développement des MB, j'ai cherché à déterminer si la surexpression de la protéine dans cette structure pouvait provoquer elle aussi un défaut dans les MB (**Figure 72**). On peut voir que la surexpression d'*App1* grâce à *c739*-GAL4 ne provoque aucun défaut dans le développement des MB. La surexpression avec *OK107*-GAL4 entraîne un faible phénotype de 2% de perte du lobe  $\beta$ .

#### 4.1.5 Expériences de sauvetage du mutant *App1* avec différentes constructions exprimant *App1*

J'ai effectué différents sauvetages du mutant *App1* (**Figure 73**). J'ai tout d'abord utilisé une duplication du gène *App1*. On peut voir que l'expression de cette duplication permet de sauver de façon significative le phénotype du mutant *App1*. J'ai utilisé comme contrôle à cette expérience une souche, nommée *Dp-y*, dans laquelle a été inséré un plasmide vide (le même utilisé pour insérer différentes duplications dont celle d'*App1*) (Venken *et al.* 2010). Ce résultat permet de démontrer que ce phénotype de perte du lobe  $\beta$  est bien dû à la mutation du gène



**Figure 74 :** Analyse du sauvetage du mutant *App<sup>d</sup>* avec différentes constructions UAS-*App*. (A) Représentation schématique des différentes constructions exprimant des formes mutées de la protéine APPL (schéma issu de l'étude de Merdes *et al.* 2004). L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 75 :** Analyse du sauvetage du mutant *App<sup>d</sup>* avec APP humain. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

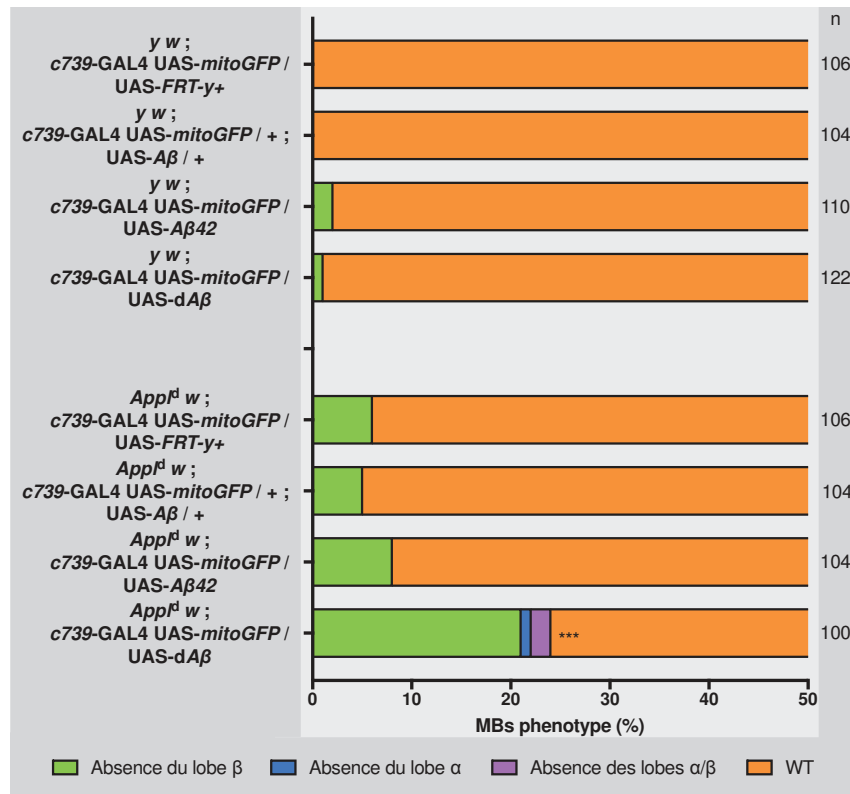
*App1*. J'ai ensuite effectué des sauvetages en exprimant *App1* uniquement dans les MB. Pour cela j'ai utilisé deux GAL4 différents : *c739* et *MB247*. On peut voir que l'expression de l'UAS-*App1* par l'un comme l'autre des deux GAL4 permet de sauver de façon significative le mutant *App1<sup>d</sup>*. Cependant le sauvetage semble meilleur avec *MB247*-GAL4.

J'ai ensuite effectué un sauvetage du mutant *App1* en exprimant différentes formes de la protéine APPL. Pour cela j'ai utilisé *MB247*-GAL4 (**Figure 74**). L'expression d'une forme sécrétée d'APPL (*App1.s*) ou d'une forme ne pouvant pas être sécrétée (*App1.sd*) induisent toutes deux une diminution du phénotype bien que non significative. De plus l'expression de différentes formes, toutes ne pouvant pas être sécrétées, et délétées dans le domaine intracellulaire (*App1.sd $\Delta$ IC* et *App1.sd $\Delta$ NPTY*), ou dans le domaine extracellulaire (*App1.sd $\Delta$ E1* et *App1.sd $\Delta$ E2*) entraînent une diminution du phénotype. Du fait que le phénotype du mutant *App1* pour cette souche est relativement faible (7% absence du lobe  $\beta$ ) dans cette expérience, ces résultats sont difficilement interprétables.

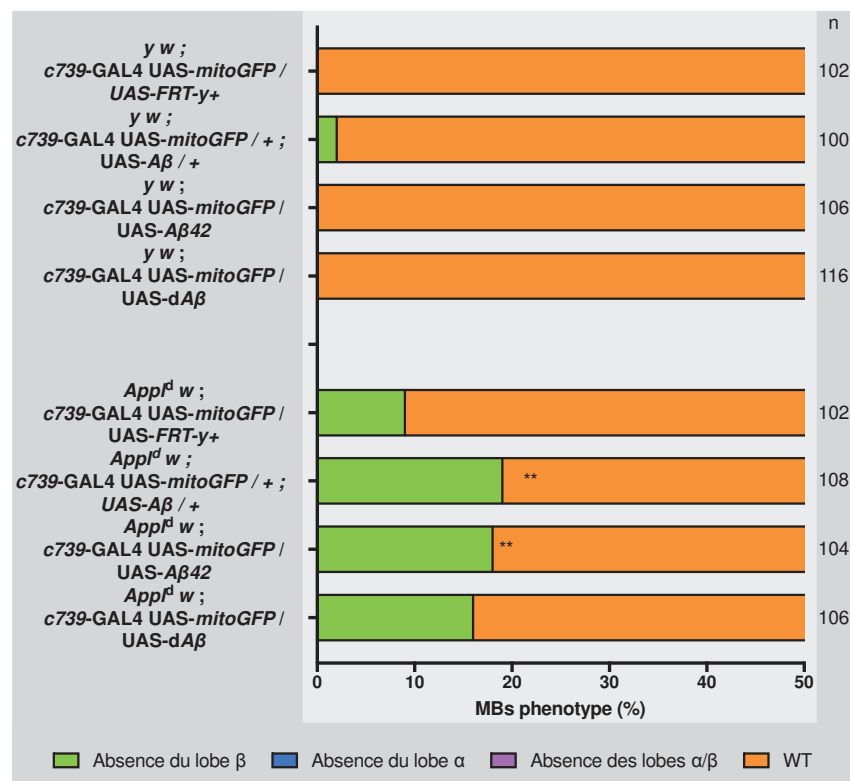
#### 4.1.6 Expériences de sauvetage du mutant *App1* avec la forme humaine APP

La conservation de nombreux domaines intra et extracellulaires entre les formes humaines et drosophiles laissent penser qu'il pourrait y avoir une conservation dans la fonction de ces protéines. Afin de valider cette hypothèse, j'ai exprimé la forme humaine APP sous le contrôle soit de *MB247*-GAL4, soit de *c739*-GAL4 dans un contexte mutant pour *App1* (**Figure 75**). On peut voir qu'avec l'un ou l'autre des GAL4, l'expression d'APP permet de diminuer le phénotype de perte du lobe  $\beta$  mais de façon non significative. Ces résultats nous laissent penser que la forme humaine ne compense que partiellement la perte de la protéine drosophile. L'homologie fonctionnelle a été confirmée par la suite grâce au sauvetage du





**Figure 76 :** Analyse de l'interaction du mutant *App<sup>Δ</sup>* avec l'expression des fragments Aβ humain et de drosophile. Dissection de cerveau mâle adulte âgé de 5 jours. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β: \*\*\* p<0,001.



**Figure 77 :** Analyse de l'interaction du mutant *App<sup>Δ</sup>* avec l'expression des fragments Aβ humain et de drosophile. Dissection de cerveau mâle adulte âgé de 21 jours. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β : \*\* p<0,01.

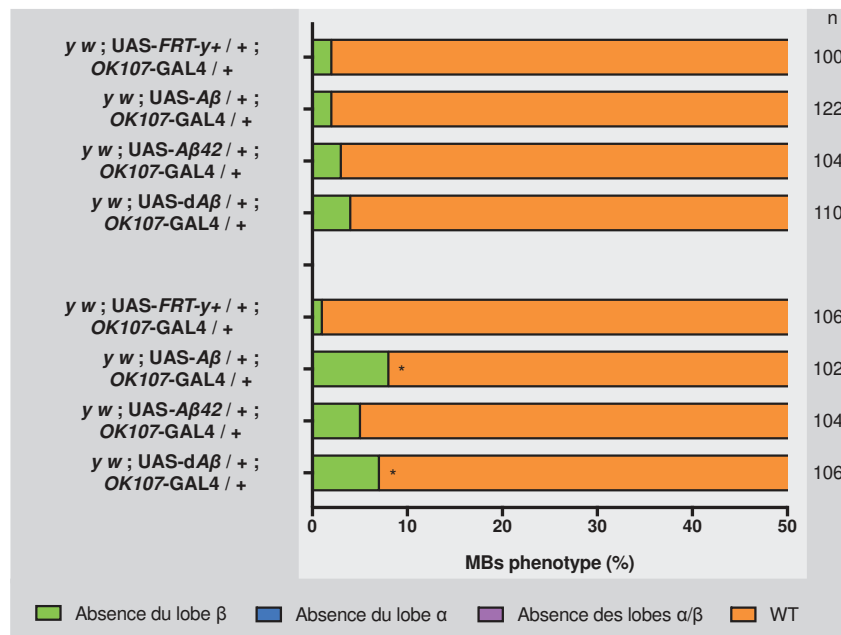
double mutant *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* (voir résultats supplémentaires Figure 87 p.167).

#### 4.1.7 Expériences d'interaction du mutant *Appl* avec différentes constructions

##### UAS d'A $\beta$

La mise en évidence d'une région A $\beta$  dans la protéine APPL, entraînant le même phénotype que le peptide A $\beta$  humain (Carminne-Simmen *et al.* 2009), nous a incité à nous demander si cette région spécifique d'APPL avait un effet dans les MB. Pour répondre à cette question nous avons comparé le phénotype des neurones  $\alpha/\beta$  exprimant soit la forme drosophile A $\beta$ , soit la forme humaine A $\beta$ . Ces résultats ont été obtenus dans le cadre du stage de Zoé Servant, étudiante de Master1. Les dissections se sont faites à 5 jours après éclosion. L'expression de ces différentes formes dans un contexte sauvage n'a que très peu d'effet sur le développement des neurones  $\alpha/\beta$  (**Figure 76**). Si on se place dans un contexte mutant pour *Appl*, l'expression des formes humaines ne modifie pas le phénotype, par contre l'expression de la forme drosophile entraîne une augmentation significative du phénotype (22% de perte du lobe  $\beta$ ). Cela peut révéler un lien entre le rôle physiologique d'APPL et le peptide A $\beta$ .

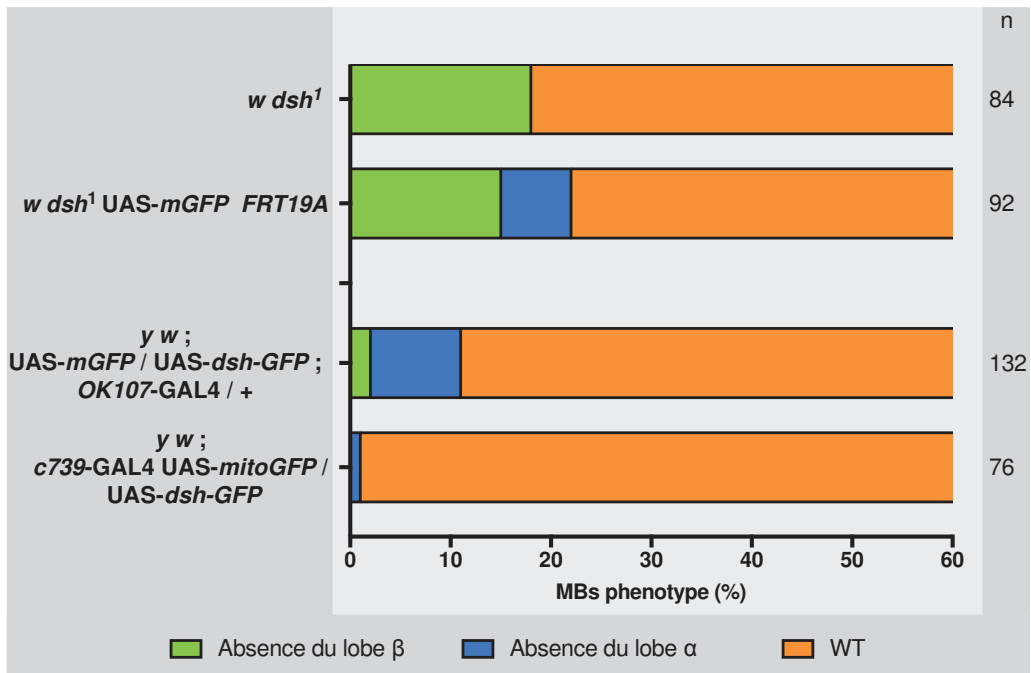
L'expression du peptide A $\beta$  chez l'homme entraîne une dégénérescence s'aggravant dans le temps. Nous avons regardé si ce phénomène se produisait aussi dans les neurones  $\alpha/\beta$  lorsqu'on laissait vieillir les mouches. Nous avons donc regardé le phénotype à 21 jours (**Figure 77**). A 21 jours comme à 5 jours, l'expression des différentes formes A $\beta$  dans un contexte sauvage n'entraîne aucun phénotype dans les MB. Dans un contexte mutant pour *Appl*, on peut déjà remarquer que le phénotype du mutant *Appl<sup>d</sup>* ne diffère pas lorsqu'on regarde à 5 ou 21 jours. Par contre, on voit que l'expression du peptide A $\beta$  humain entraîne une



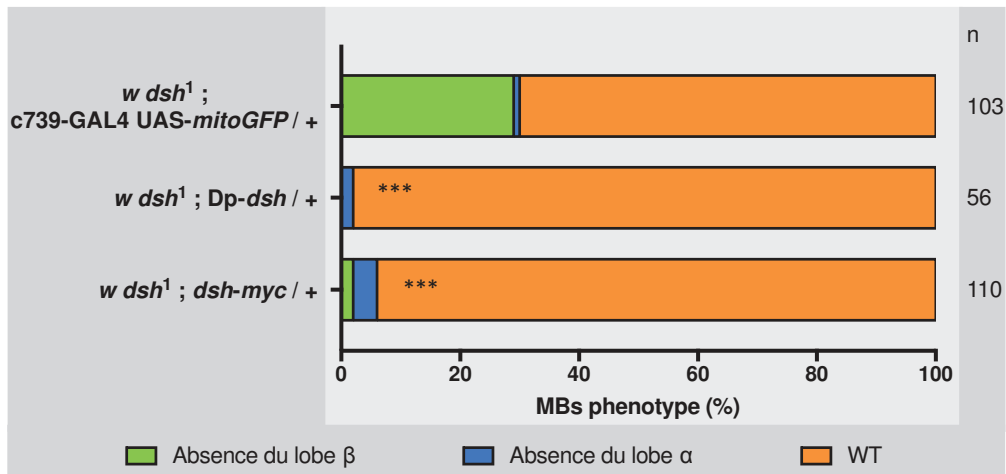
**Figure 78 : Analyse de l'expression des fragments Aβ humain et de drosophile dans les MB en fonction de l'âge de la drosophile.** Dissection de cerveau mâle adulte âgé de 5 jours (panel haut) et 21 jours (panel bas). L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  : \*  $p < 0,05$ .

augmentation significative de la perte du lobe  $\beta$ . L'expression de la forme drosophile entraîne aussi une augmentation, mais non significative. Ces résultats laissent penser que l'expression du peptide A $\beta$  humain entraîne une dégénérescence des neurones  $\alpha/\beta$  s'accroissant avec le vieillissement de la mouche. Les résultats similaires obtenus avec la forme A $\beta$  drosophile confirment l'hypothèse que cette région spécifique d'APPL possède les mêmes caractéristiques toxiques bien que la séquence ne soit pas conservée.

Ayant mis en évidence un effet dégénératif de ces peptides dans un contexte mutant pour *App1*, j'ai essayé de reproduire ce phénotype dans un contexte sauvage (**Figure 78**). L'expression des différents peptides avec *OK107-GAL4* ne produit aucun effet à 5 jours. Cependant, lorsqu'on regarde à 21 jours, l'expression des formes humaines et drosophile entraîne une perte du lobe  $\beta$  d'environ 10%.



**Figure 79:** Analyse du mutant et de la surexpression de *dsh*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 80:** Analyse du sauvetage du mutant *dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$ : \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 4.2. Le gène *dsh*

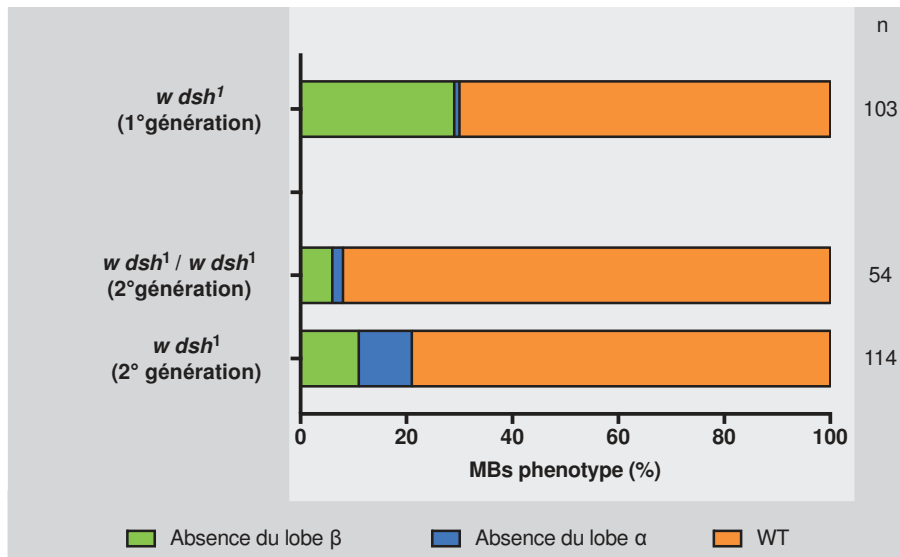
### 4.2.1 Analyse du phénotype du mutant et de la surexpression *dsh*

Les mutants *dsh*<sup>1</sup> présentent des défauts dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ , mais la pénétrance de ces défauts n'est pas complète. De façon générale, les défauts des mutants *dsh*<sup>1</sup> concernent majoritairement le lobe  $\beta$ , bien que le lobe  $\alpha$  puisse être aussi affecté (**Figure 79**). Cependant, il semblerait que la pénétrance du phénotype puisse varier selon le background, ce qui met en avant l'importance de réaliser un contrôle pour chaque expérience d'interaction génétique, tout comme on le fait pour l'étude du mutant *App*<sup>1d</sup>.

J'ai testé ensuite l'effet de la surexpression de *dsh* dans les MB (**Figure 79**). Lorsque *dsh* est fortement exprimé avec *OK107*-GAL4, il produit des défauts des lobes  $\alpha$ . Lorsqu'il est exprimé avec *c739* il ne produit qu'un très faible phénotype sur les lobes  $\alpha$ .

Ces résultats démontrent un effet de la quantité de DSH sur le développement des MB. En effet, que DSH soit mutant ou surexprimé, il entraîne des défauts de développement des lobes  $\alpha$  et  $\beta$ .

Afin de confirmer que ces phénotypes mutants soient bien dus à la mutation *dsh*<sup>1</sup>, j'ai effectué des sauvetages de mutant avec une duplication de *dsh* (duplication d'environ 80kb de ADN génomique qui comporte plusieurs gènes dont *dsh*) (Venken *et al.* 2010) et une construction génomique de *dsh* marquée à l'aide d'une construction myc. On peut voir que l'une comme l'autre des deux souches permettent de sauver significativement le mutant *dsh* (**Figure 80**).



**Figure 81 :** Analyse de la variabilité du phénotype mutant de l'allèle *dsh<sup>1</sup>* en condition homozygote ou hémizygote. La première barre du panel correspond à la descendance mâle (1ere génération) issue du croisement de femelle *w dsh<sup>1</sup>* avec des mâles *y<sup>w</sup>* (CS). Le reste du panel correspond à la descendance issue d'un croisement à partir de femelle *w dsh<sup>1</sup>* avec des mâles *w dsh<sup>1</sup>* (1ere génération). L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

Clone		WT	lobe β absence	lobe α absence	/ lobe β absence	n=	n MB
WT	NB	100%	0%	0%	0%	37	148
<i>dsh<sup>1</sup></i>	NB	99%	0%	1%	0%	76	306

**Figure 82 :** Clones MARCM canoniques de *dsh<sup>1</sup>*. Les clones neuroblastes ont été induits en L1 suite à un choc thermique d'une heure à 37°C. NB=Neuroblaste. n = nombre de clones observés. n MB = nombre de MB observés.

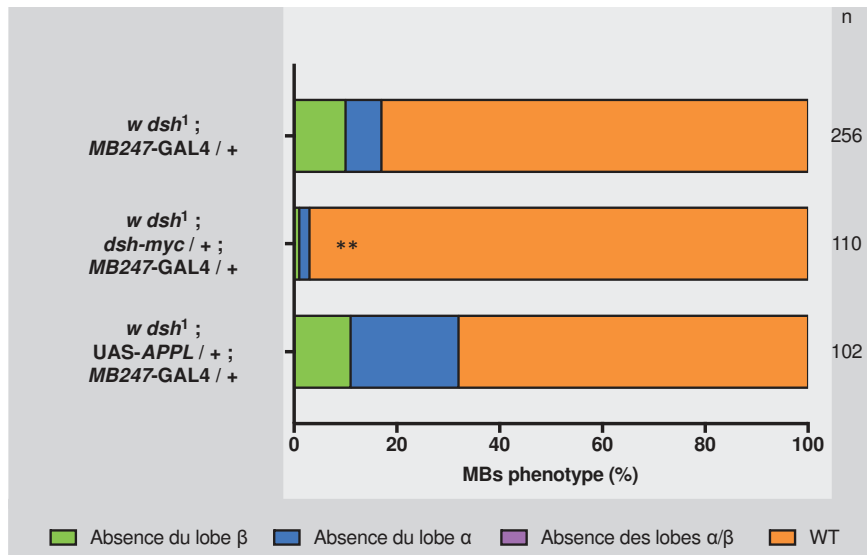
Lorsque j'ai voulu travailler avec ce mutant en femelle, un problème de pénétrance du phénotype est apparu, semblable à celui obtenu avec le mutant *Appl<sup>d</sup>* (**Figure 81**). Lorsque des femelles *dsh<sup>1</sup>* sont croisées avec des mâles sauvages, 30% de la descendance mâle mutante pour *dsh* présente un phénotype de perte du lobe  $\beta$ . Cependant, dès qu'on croise ces mâles avec des femelles *dsh<sup>1</sup>*, le phénotype des femelles homozygotes ou des mâles hémizygotés issus de ce croisement est fortement réduit. Ces résultats démontrent que les phénotypes de perte des lobes  $\alpha$  et  $\beta$  sont très sensibles au background génétique.

#### 4.2.2 Analyse des clones MARCM canoniques *dsh<sup>1</sup>*

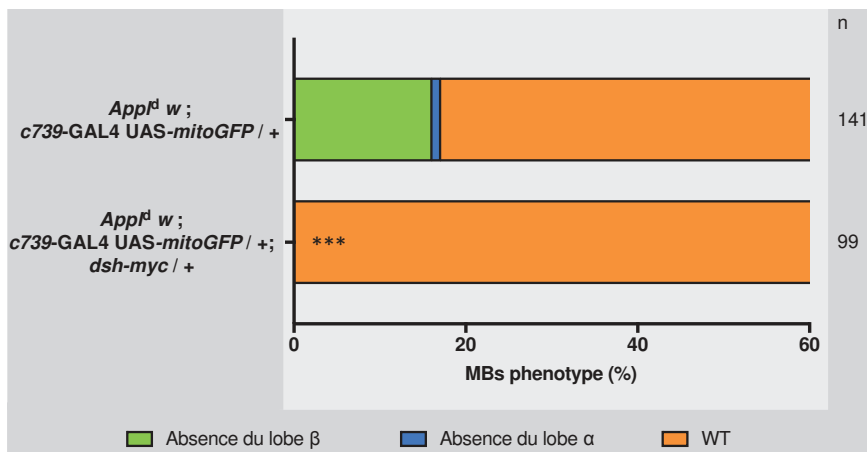
Les protéines APPL et DSH ayant toutes deux une fonction dans la voie PCP pour le développement du lobe  $\beta$ , nous pouvons supposer que le phénotype cellulaire des mutants *dsh<sup>1</sup>* affecte la pousse des axones  $\beta$ , tout comme elle a été décrite pour *Appl*. J'ai réalisé des clones MARCM canoniques du mutant *dsh<sup>1</sup>*. Sur les 76 clones neuroblastes obtenus, seul 1% d'entre eux montraient un défaut du lobe  $\beta$  (**Figure 82**). Face à cette faible pénétrance du phénotype, nous n'avons pas tenté d'obtenir des clones d'un seul neurone.

Ces résultats en clone rejoignent ceux obtenus par Ng 2012 avec les clones *dsh<sup>3</sup>*. Avec cet allèle *dsh<sup>3</sup>*, nul et létal homozygote, la totalité des clones obtenus était sauvage. L'hypothèse pour expliquer ces résultats est que *dsh* ne serait pas autonome cellulaire, mais autonome au niveau des MB. Le manque de cette protéine dans un seul ou groupe de neurones n'est pas suffisant pour avoir un phénotype mutant, par ce que l'ensemble des autres neurones de cette structure exprime cette protéine, pousse normalement et entraîne avec eux les neurones mutants.

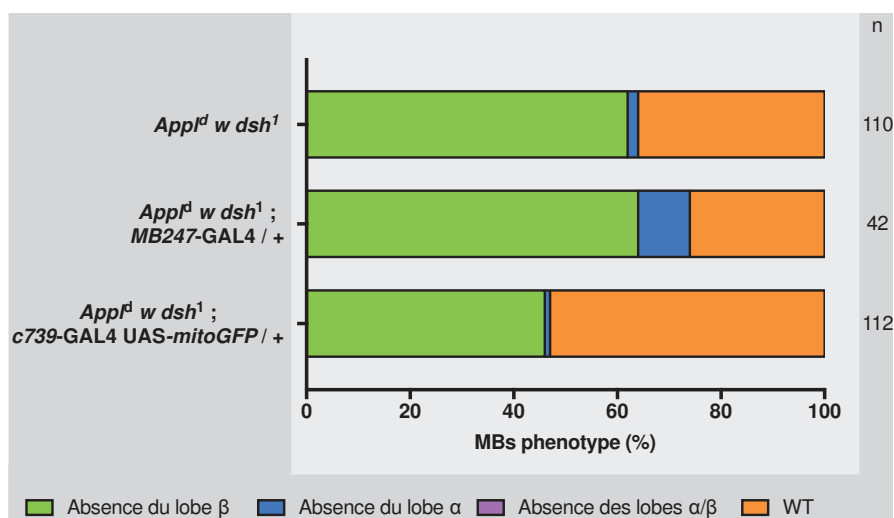




**Figure 83 : Analyse de la surexpression d'*Appl* chez le mutant *dsh<sup>1</sup>*.** L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*  $p < 0,01$ .



**Figure 84 : Analyse de la surexpression de *dsh* chez le mutant *Appl<sup>D</sup>*.** L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 85 : Analyse du double mutant *Appl<sup>D</sup> dsh<sup>1</sup>*.** L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés

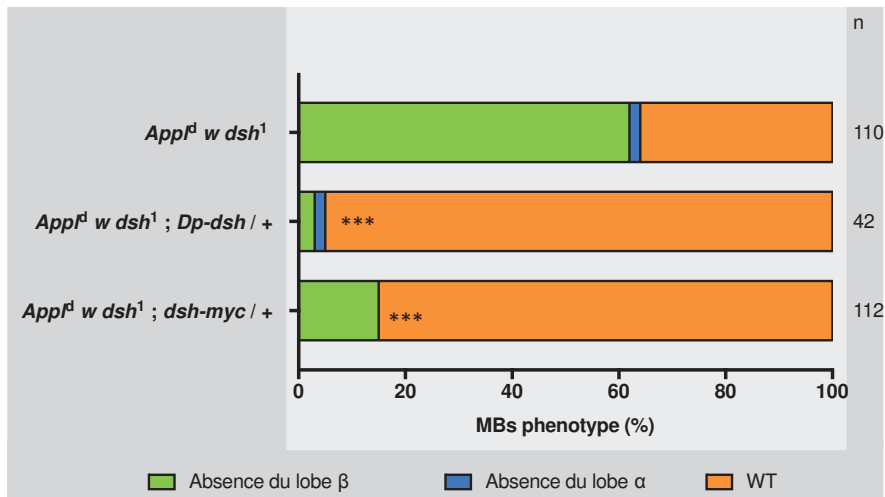
#### 4.2.3 Interaction génétique entre *App1* et *dsh*

Pour permettre un développement normal des neurones  $\alpha/\beta$ , il a été montré que DSH et APPL était nécessaire pour activer la voie PCP (Soldano *et al.* 2013). En partant de ce modèle, j'ai effectué différentes expériences d'interaction génétiques entre ces deux gènes au début de ma thèse.

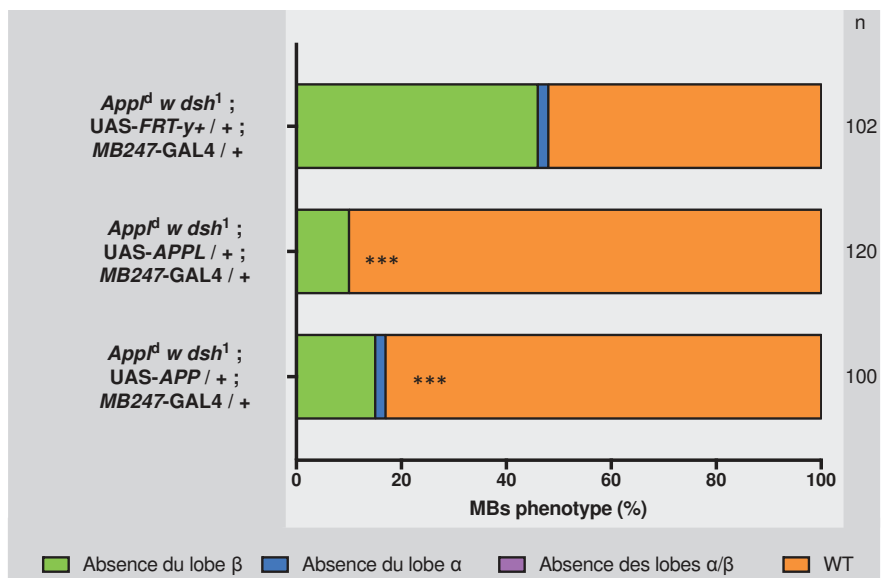
Je montre tout d'abord que le mutant *dsh*<sup>1</sup>, bien que sauvé par une construction génomique exprimant *dsh*, n'est pas sauvé quand j'exprime *App1* spécifiquement dans les neurones  $\alpha/\beta$  (**Figure 83**).

Inversement, l'expression de *dsh* permet de sauver significativement le mutant *App1*<sup>d</sup> (**Figure 84**). Ces expériences confirment le modèle selon lequel APPL est en aval de DSH dans la croissance des axones  $\beta$ .

Nous avons ensuite recombiné les deux mutations *App1*<sup>d</sup> et *dsh*<sup>1</sup> (**Figure 85**). Les hémizygotés double mutants ont un phénotype atteignant 60% de perte du lobe  $\beta$ . Cela confirme le fait que ces deux protéines interviennent dans la même voie pendant le développement des MB. J'ai ensuite associé ce chromosome recombiné avec différents GAL4. Lorsque le double mutant est associé à *MB247*-GAL4, le phénotype de perte du lobe  $\beta$  se maintient autour des 60%, alors que lorsque le double mutant est associé à *c739*-GAL4, le phénotype est légèrement réduit et atteint plutôt 45-50% de perte du lobe  $\beta$ . Cela montre que le double mutant est lui aussi sensible au background, comme nous l'avons vu précédemment pour les deux mutations individuellement.



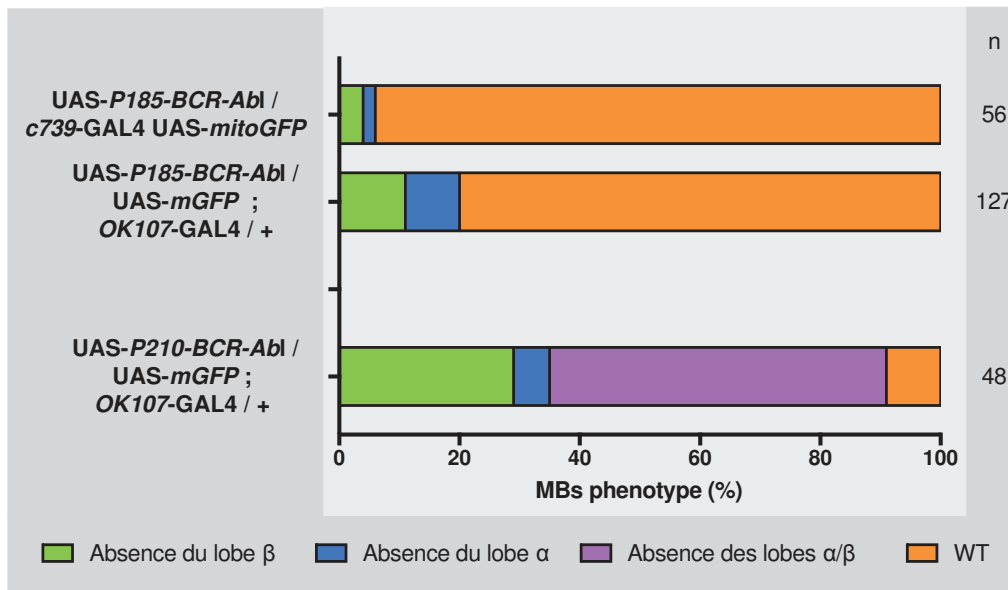
**Figure 86 :** Analyse du sauvetage de double mutant *App<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* par *dsh*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .



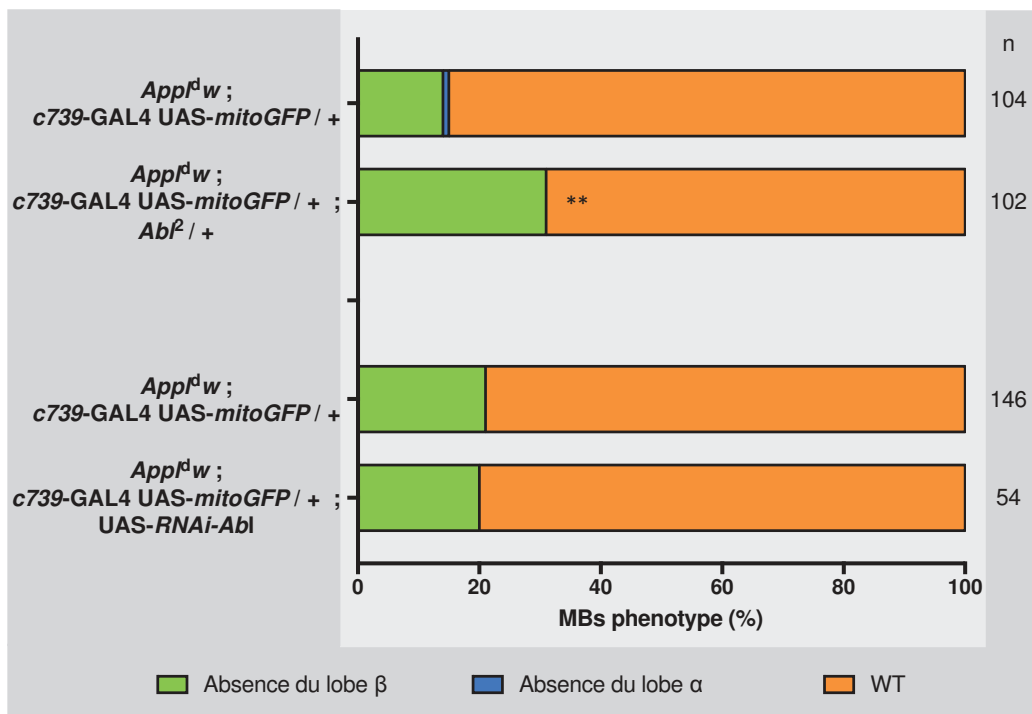
**Figure 87 :** Analyse du double mutant *App<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .

J'ai par la suite effectué des sauvetages de ce phénotype en exprimant l'un ou l'autre de ces deux gènes. On observe, d'une part, que le phénotype 60% de perte du lobe  $\beta$  est sauvé de façon significative lorsque j'exprime soit une duplication de la région où est exprimé *dsh*, soit une construction génomique de *dsh* (**Figure 86**).

D'autre part, la perte du lobe  $\beta$  du double mutant *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* est aussi sauvé de façon significative lorsqu'on exprime *Appl* spécifiquement dans les neurones  $\alpha/\beta$  (**Figure 87**). Afin de valider l'hypothèse d'une conservation fonctionnelle entre les protéines de drosophile et humaine, j'ai exprimé la forme humaine APP dans les mêmes neurones (avec le même GAL4). On peut voir que l'expression de cette forme humaine permet un sauvetage significatif du phénotype de perte du lobe  $\beta$ .



**Figure 88 :** Analyse de l'expression du fragment BCR-ABL dans les MB. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 89 :** Analyse de la perte de fonction partielle d'Abl chez le mutant App<sup>fl</sup>. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*  $p < 0,01$ .

### 4.3 Le gène *Abl*

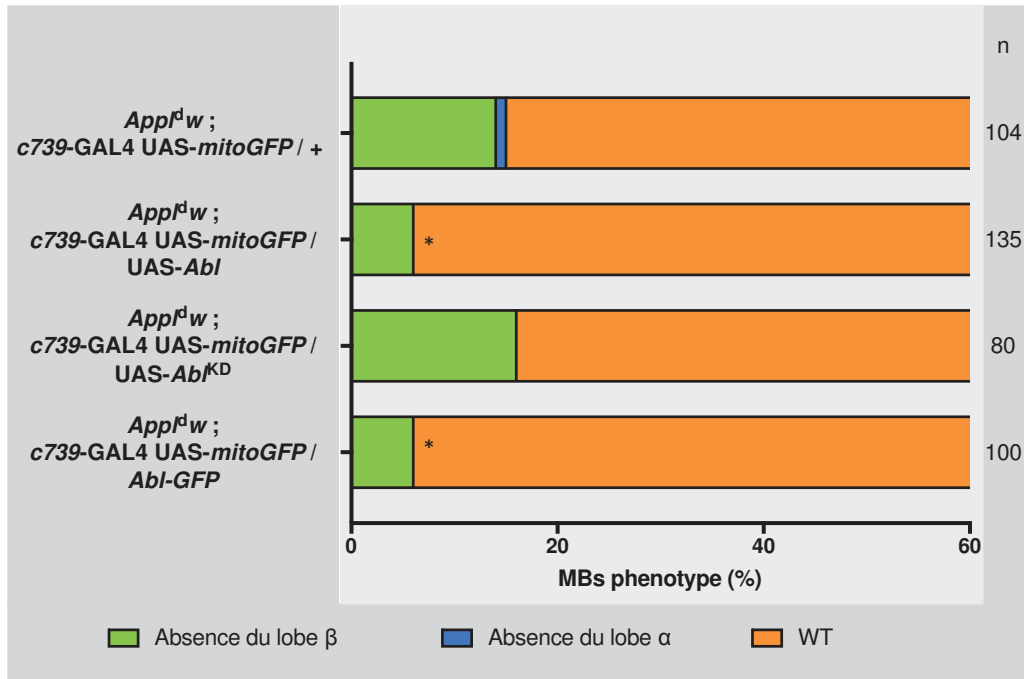
J'ai démontré précédemment que la régulation de l'activité d'ABL était nécessaire pour une croissance normale des neurones  $\alpha/\beta$ .

Suite à ces expériences, j'ai voulu observer l'effet d'une construction *BCR-Abl*, connue pour être la forme oncogène d'ABL chez l'homme. Ici, nous utilisons une construction chimérique associant une partie du gène *Abl* de la drosophile et une partie du gène *Bcr* humain (**Figure 88**). Tout comme chez l'homme, l'association de *Bcr* à *Abl* empêche la régulation de l'activité kinase de la protéine. On voit que la forme *P185-BCR-Abl* ne produit que très peu de phénotype, qu'elle soit exprimée sous le contrôle de *c739-GAL4* ou *OK107-GAL4*. A l'inverse, l'expression de la forme *P210-BCR-Abl* produit de sévère phénotype mutant, avec moins de 10% de MB sauvage, lorsqu'elle est exprimée avec *OK107-GAL4*. Il faut aussi noter une forte létalité de ce génotype, avec des défauts de développement des yeux et de la tête important. De plus, l'expression de cette forme *P210-BCR-Abl* avec *c739-GAL4* est létale.

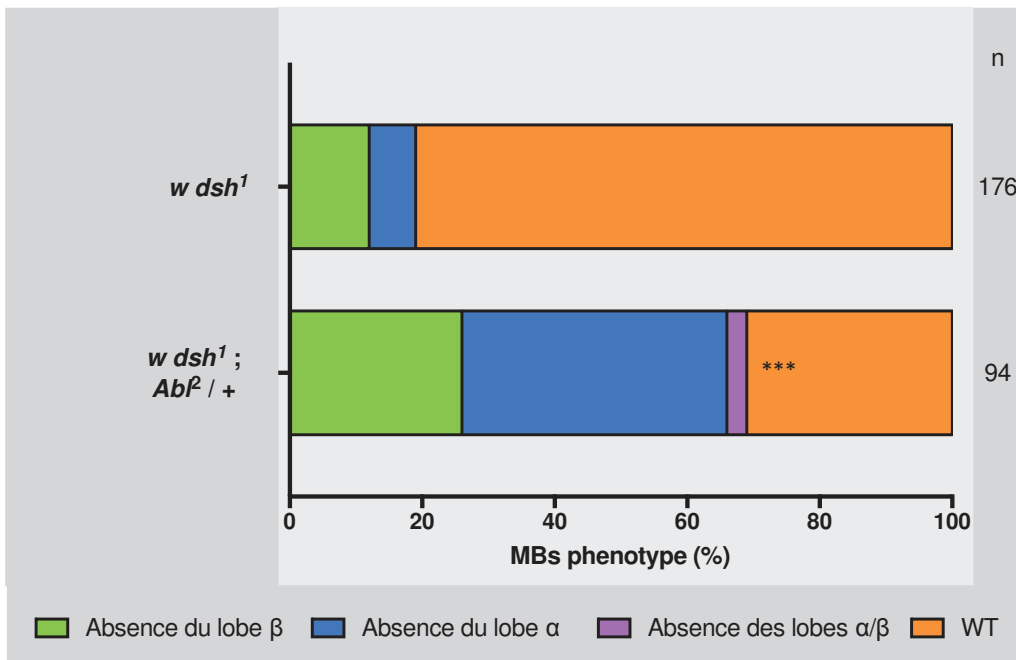
Ces résultats confirment l'effet néfaste d'une dérégulation de l'activité kinase d'ABL lors du développement des MB et du système nerveux de façon plus générale.

#### 4.3.1 Interaction génétique entre *Appl* et *Abl*

J'ai ensuite observer l'interaction génétique entre *Abl* et *Appl* (**Figure 89**). Le phénotype de perte du lobe  $\beta$  du mutant *Appl<sup>d</sup>* est augmenté significativement lorsqu'on est hétérozygote mutant pour *Abl<sup>2</sup>*. Par contre, ce phénotype n'est pas modifié lorsque j'ai exprimé une construction ARNi contre *Abl* dans les MB. Cette construction ne produisant, par elle-même, aucun phénotype lorsqu'elle est exprimée par ce GAL4, il n'est pas surprenant que, dans cette condition, aucun changement ne se produise.



**Figure 90 :** Analyse de la surexpression d'*Abl* chez le mutant *AppI<sup>dw</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  : \*  $p < 0,05$ .



**Figure 91 :** Analyse de la perte de fonction partielle d'*Abl* chez le mutant *dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β : \*\*\*  $p < 0,001$ .

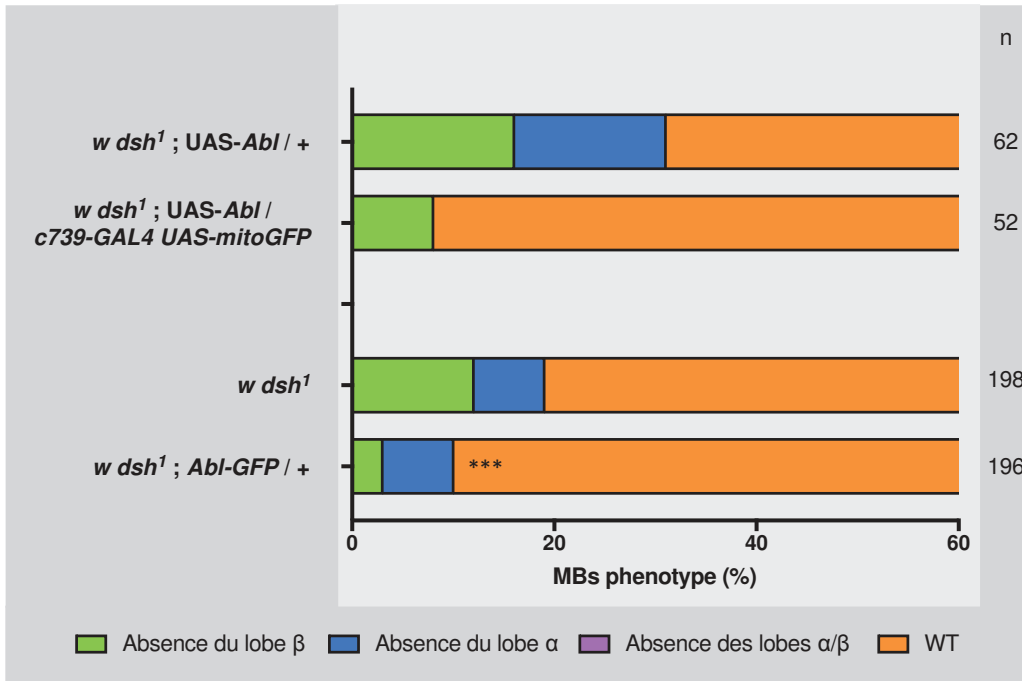
Puisqu'il a été mis en évidence que le mutant *Abl* augmente la pénétrance du mutant *Appl<sup>d</sup>*, j'ai regardé ensuite l'effet de la surexpression d'*Abl* sur ce mutant *Appl<sup>d</sup>* (**Figure 90**). Tout d'abord, l'expression d'une construction génomique d'*Abl* (*Abl-GFP*) sauve de façon significative le mutant *Appl<sup>d</sup>*. De plus, nous pouvons observer que la surexpression d'*Abl* dans les MB avec *c739-GAL4* permet, là aussi, de sauver de façon significative le phénotype de perte du lobe  $\beta$  du mutant *Appl<sup>d</sup>*. A l'inverse, la surexpression d'une forme *Abl* sans activité kinase (*UAS-Abl<sup>KD</sup>*) avec le même GAL4 ne permet plus de sauver le phénotype du mutant *Appl<sup>d</sup>*. Ces résultats, similaires à ceux obtenus dans l'étude de Soldano *et al.* 2013, confirment d'une part l'implication de ces gènes dans la même voie de signalisation, la voie PCP, pendant le développement des MB. D'autre part, le fait que la surexpression d'*Abl* spécifiquement dans les MB puisse sauver le phénotype de perte du lobe  $\beta$  soutient l'hypothèse selon laquelle *Abl* agirait de façon autonome au niveau des MB.

#### 4.3.2 Interaction génétique entre *Appl*, *dsh* et *Abl*

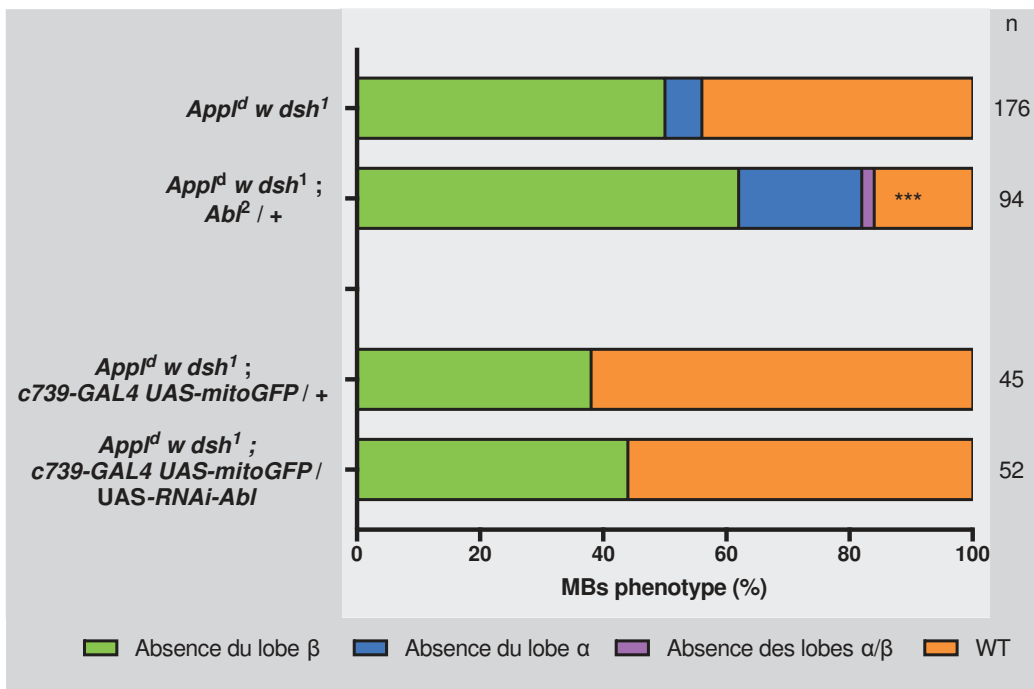
##### 4.3.2.1 Interaction génétique entre *dsh* et *Abl*

L'implication d'APPL et ABL dans l'activation voie PCP pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$  étant établie, nous avons supposé pouvoir observer une interaction génétique entre *Abl* et *dsh*, lui aussi impliqué dans cette voie (**Figure 91**). J'ai tout d'abord montré que le phénotype mutant de l'allèle *dsh<sup>1</sup>* est aggravé quand les mouches sont mutantes hétérozygotes pour *Abl*. On remarque que le lobe  $\alpha$  semble plus sensible face à la perte simultanée de *dsh* et *Abl*. Cela nous montre qu'en plus de leur rôle dans la croissance des axones  $\beta$ , ces deux protéines ont probablement des rôles majeurs dans le développement des axones  $\alpha$ .





**Figure 92 :** Analyse de la surexpression d'*Abl* chez le mutant *dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 93 :** Analyse de la surexpression d'*Abl* chez le mutant *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype des MB sauvage : \*\*\*  $p < 0,001$ .

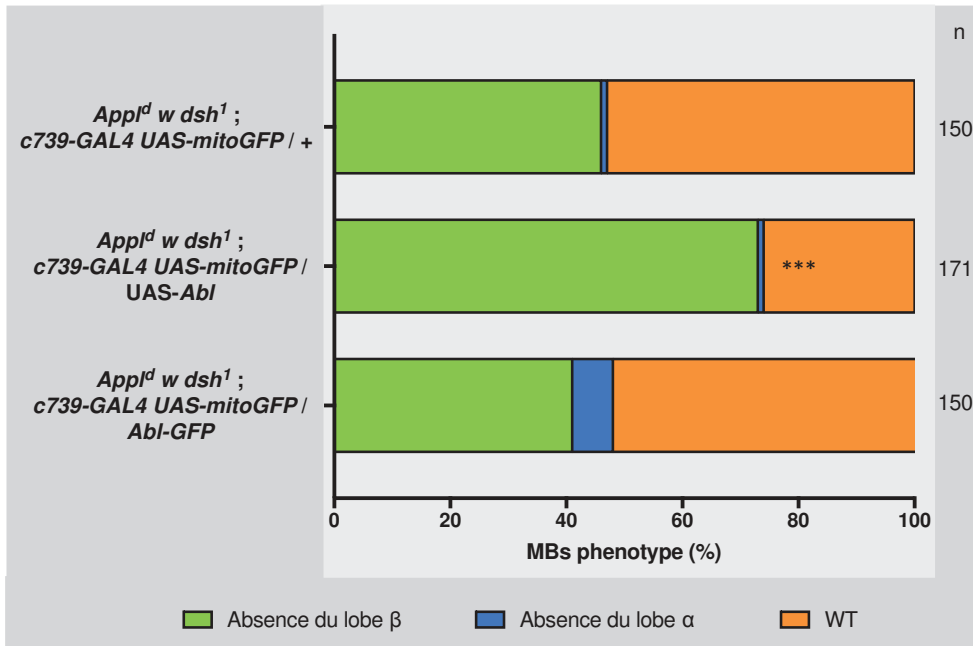
J'ai ensuite regardé l'effet de la surexpression d'*Abl* chez le mutant *dsh*<sup>1</sup> (**Figure 92**). On peut voir que le phénotype de croissance du lobe  $\beta$  est sauvé lorsqu'on surexprime *Abl*, et ce que cela soit avec c739-GAL4 (bien que le sauvetage soit non significatif) ou avec la forme génomique.

Ce sauvetage de *dsh*<sup>1</sup> par la surexpression d'*Abl* était imprévu. En effet, ABL étant en amont de DSH dans la voie PCP, moduler la dose de cette protéine chez un mutant nul pour *dsh* n'aurait pas dû avoir de conséquence sur le phénotype (comme nous l'avions déjà observé avec la surexpression d'*Appl* (**Figure 83**)). Afin d'expliquer ces résultats, nous avons avancé deux hypothèses : la première serait que le mutant *dsh*<sup>1</sup> ne serait pas totalement nul pour la fonction de *dsh* dans la voie PCP, ainsi lorsqu'on surexprime *Abl* on forcerait l'activité de DSH fonctionnel restant. La deuxième hypothèse serait qu'il existerait une autre voie qui contrôlerait la pousse des axones  $\beta$ , indépendante de *dsh* et sur laquelle *Abl* agirait aussi.

#### 4.3.2.2 Interaction génétique entre *Appl*, *dsh* et *Abl*

Je me suis ensuite intéressée à l'interaction génétique entre *Appl*, *dsh* et *Abl*. On peut voir que, comme dans le cas des simples mutants *Appl*<sup>d</sup> ou *dsh*<sup>1</sup>, le phénotype du double mutant *Appl*<sup>d</sup> *dsh*<sup>1</sup> est lui aussi aggravé lorsqu'on est hétérozygote mutant pour *Abl* (**Figure 93**). On peut voir qu'on augmente significativement aussi bien la pénétrance de perte du lobe  $\beta$  que celui du lobe  $\alpha$ . En revanche, l'expression d'un ARNi contre *Abl* dans cette condition n'augmente que très légèrement le phénotype de perte de lobe  $\beta$ .

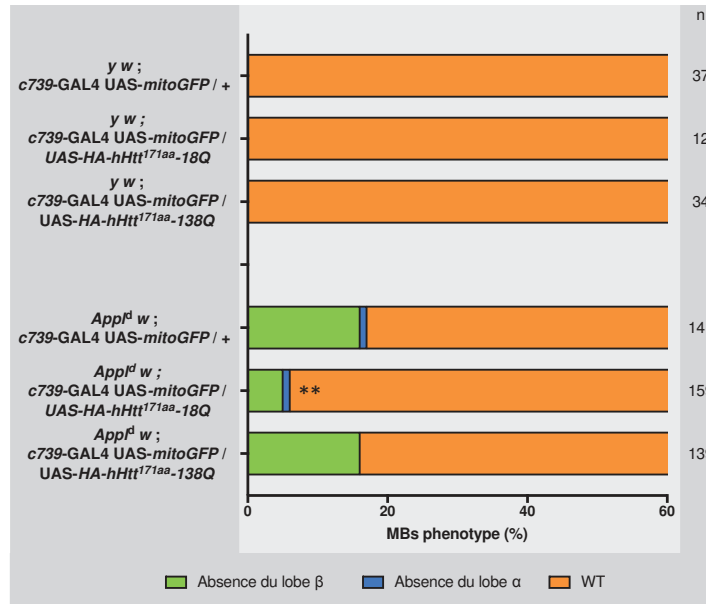
J'ai ensuite tenté de sauver ce phénotype en surexprimant *Abl* dans les MB (**Figure 94**). De façon surprenante, la surexpression d'*Abl* dans les neurones  $\alpha/\beta$  grâce à c739-GAL4 augmente significativement la perte du lobe  $\beta$ , alors qu'elle permettait de sauver



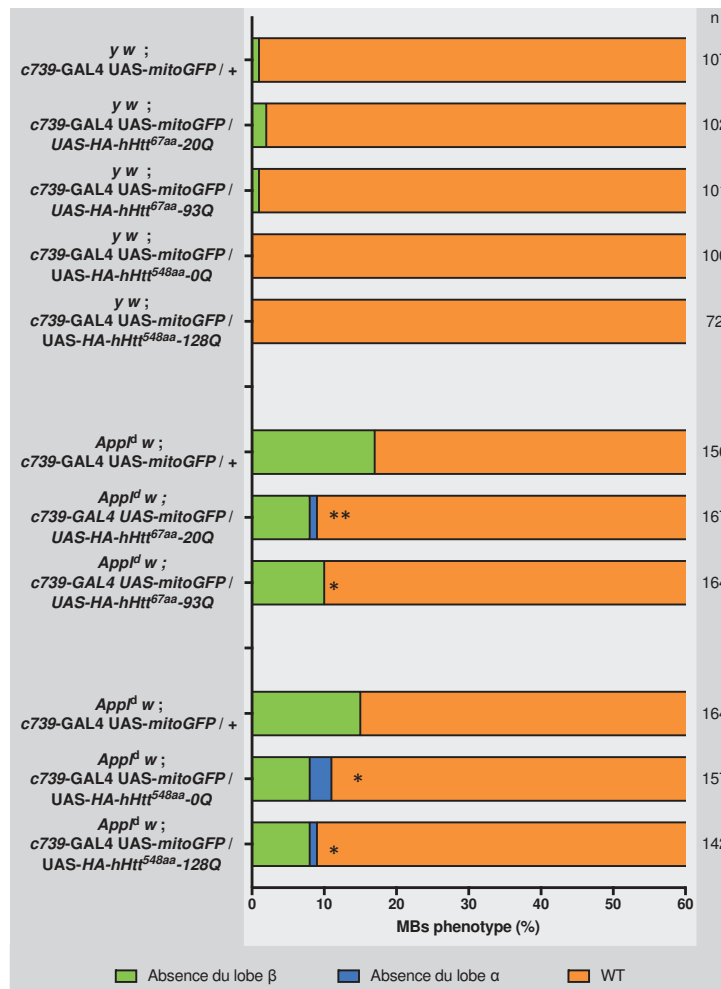
**Figure 94 :** Analyse de la surexpression d'*Abl* chez le mutant *App1<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .

le mutant *App<sup>d</sup>* et *dsh<sup>1</sup>* pris séparément. L'expression de la construction génomique, quant à elle, ne modifie pas le phénotype de perte du lobe  $\beta$ , bien qu'elle augmente légèrement la pénétrance de perte du lobe  $\alpha$ .

Ces résultats démontrent l'implication majeurs de ces trois protéines dans la croissance des axones  $\beta$  des neurones  $\alpha/\beta$ , mais aussi dans le développement des axones  $\alpha$ .



**Figure 95 :** Analyse de l'expression d'une forme *htt* humain chez le mutant *App<sup>d</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*  $p < 0,01$ .



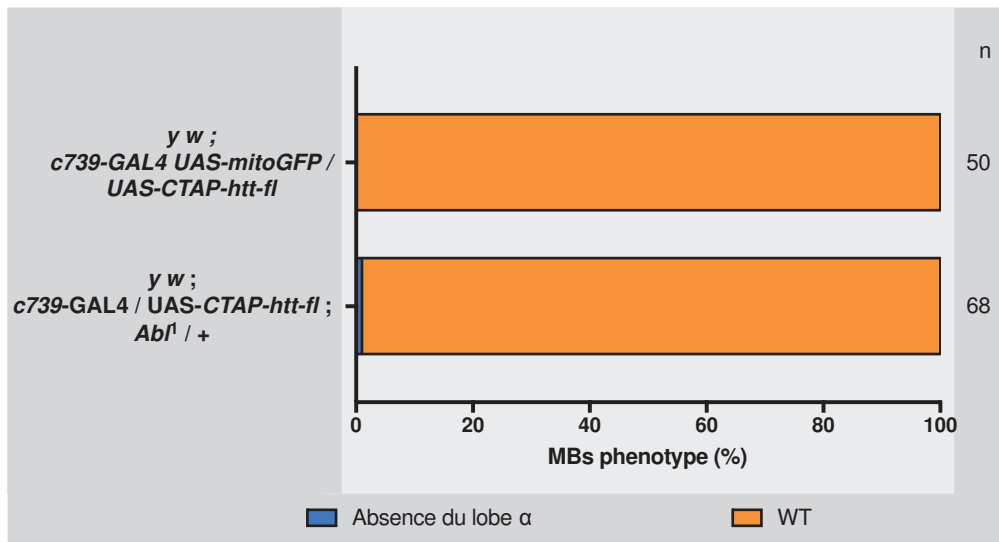
**Figure 96 :** Analyse de l'expression d'*htt* humain chez le mutant *App<sup>d</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Le gène *htt*

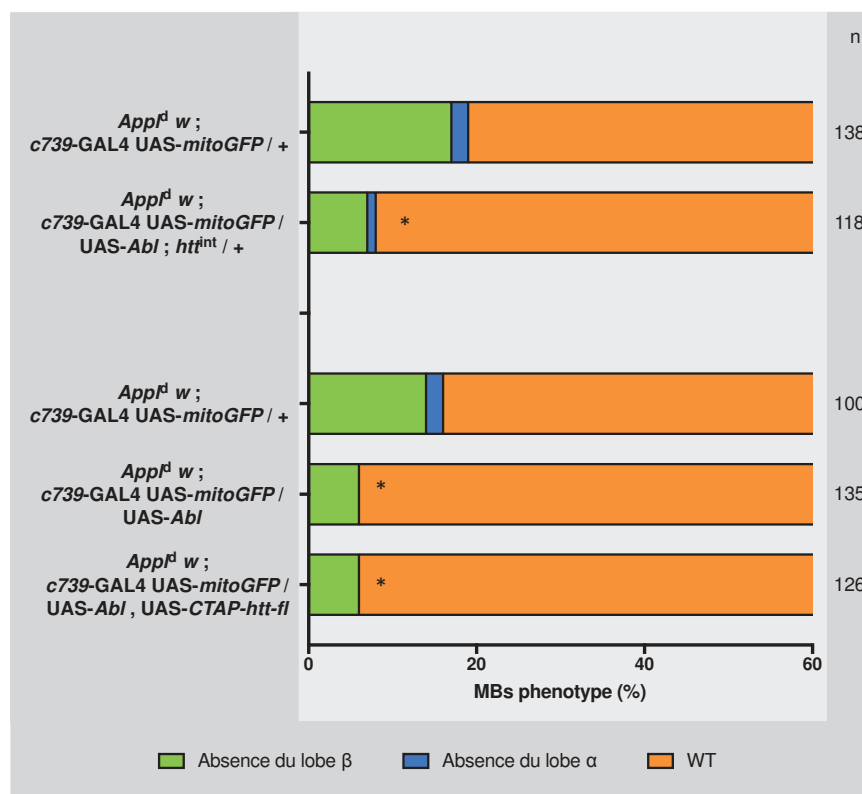
##### 4.4.1 Analyse de l'expression des formes humaines *htt* dans les MBs

Nous avons vu précédemment que la surexpression de la forme drosophile d'HTT ne produisait aucun phénotype, que cela soit par elle-même, ou en combinaison avec des mutations. En parallèle de ces expériences, j'ai réalisé une surexpression de différentes constructions exprimant un fragment de la partie N-terminale de la protéine HTT humaine (*hHtt*<sup>67aa</sup>, *hHtt*<sup>171aa</sup>, *hHtt*<sup>548aa</sup>). Ces trois fragments sont soit sous une forme physiologique, soit sous une forme pathologique pour la longueur de la région polyQ. L'expression de ces fragments de HTT polyQ permet de mimer l'agrégation de la protéine mutante observée chez l'homme. Tout d'abord l'expression de ces différentes formes (physiologique et pathologique) avec *c739*-GAL4 ne produit aucun phénotype sur le développement des MB (**Figure 95-96**). J'ai pu montrer que l'expression de la forme sauvage UAS-HA- *hHtt*<sup>171aa</sup>-18Q sauve de façon significative le phénotype du mutant *App*<sup>l<sup>d</sup></sup> (**Figure 95**). À l'inverse, l'expression de la forme polyQ UAS-HA- *hHtt*<sup>171aa</sup>-138Q n'est pas capable de sauver le mutant *App*<sup>l<sup>d</sup></sup>.

L'hypothèse que nous proposons pour expliquer ces résultats est que l'expression de cette forme sauvage de la protéine humaine a un effet dominant négatif sur la protéine endogène HTT drosophile, et permet donc de mimer les résultats obtenus avec le mutant *htt*. Ce fragment humain empêche la protéine endogène de fonctionner correctement, en prenant sa place mais sans pouvoir assurer la même fonction. L'absence de sauvetage avec le fragment polyQ peut s'expliquer soit par le fait que la répétition polyQ modifie la conformation du fragment et l'empêche de se fixer correctement à sa cible, soit par le fait que cette forme s'agrège rapidement et ne peut pas remplacer la protéine endogène. Toutefois ces deux hypothèses ne sont pas contradictoires l'une de l'autre.



**Figure 97 :** Analyse de la surexpression d'*htt* chez un mutant *Abl*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 98 :** Analyse de la surexpression d'*Abl* et/ou d'*htt* chez le mutant *App<sup>fl</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe β : \*  $p < 0,05$ .

J'ai ensuite exprimé les différents autres fragments de la protéine humaine (**Figure 96**), et j'ai pu mettre en évidence que chacune des quatre autres formes sauve significativement le mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*. Le fait que les formes polyQ sauvent aussi bien que les formes sauvages peut nous laisser penser que d'une part la présence des répétitions polyQ ne perturbe en rien l'interaction avec la cible, et d'autre part qu'elles pourraient avoir un taux d'agrégation plus faible que le fragment *hHtt<sup>171aa-138Q</sup>*, ce qui leur laisse la possibilité de remplacer la forme endogène.

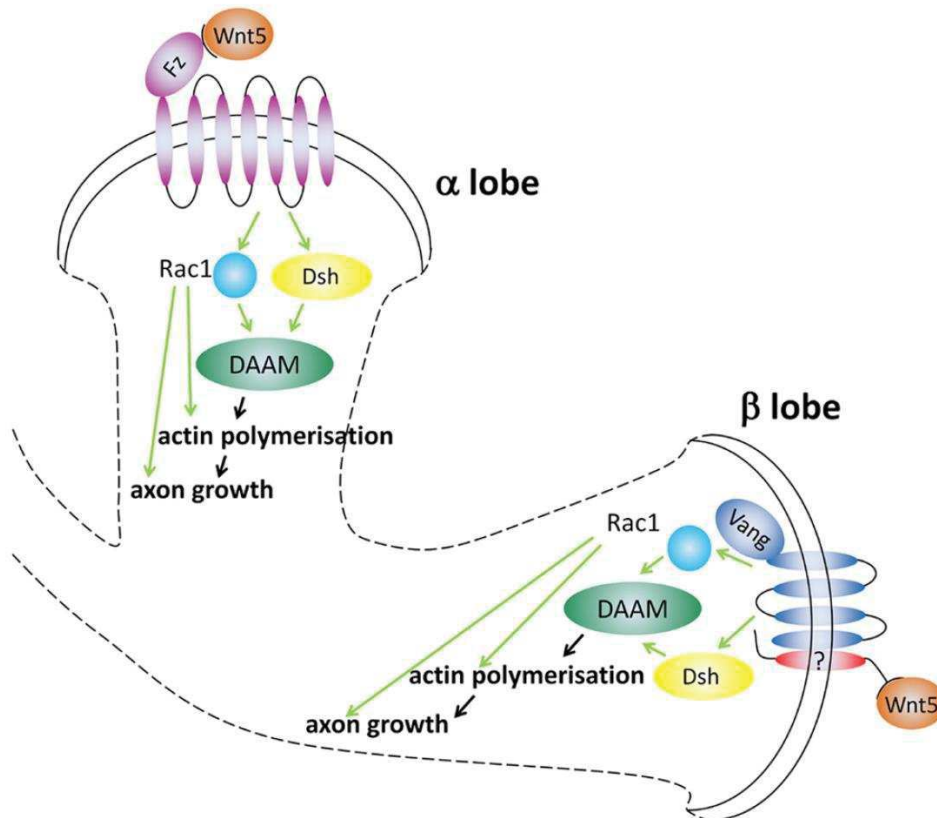
Ces résultats nous laissent supposer une conservation fonctionnelle entre les protéines drosophile et humaine dans l'interaction avec la voie PCP.

#### 4.4.2. Analyse des interactions génétiques entre *Abl* et *htt*

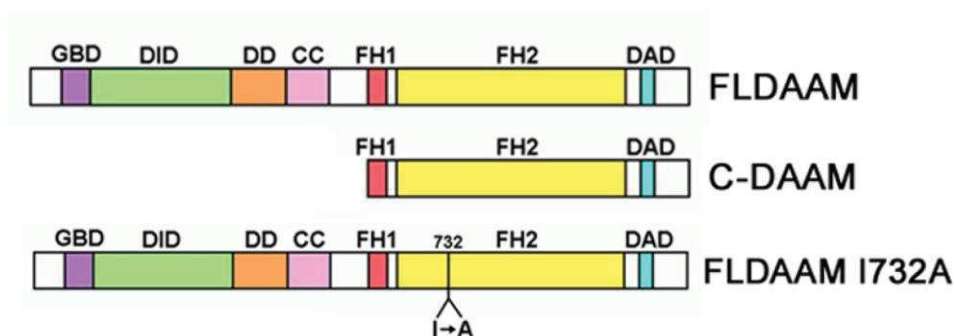
Ayant démontré que l'activité d'ABL est contrôlée par HTT, j'ai observé l'effet de la surexpression d'*htt* sur le mutant hétérozygote *Abl* (**Figure 97**). Aucun phénotype n'apparaît lorsque j'exprime l'*UAS-CTAP-htt-fl* avec *c739-GAL4* chez des individus hétérozygotes mutants *Abl<sup>l</sup>*. Cette absence de phénotype peut être due soit au GAL4 qui n'est pas assez puissant pour obtenir un effet de la surexpression, soit à un effet saturant d'*htt* endogène dans les MB et donc toute surexpression d'*htt* est inutile.

Enfin, je me suis intéressée au sauvetage du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* par la surexpression d'*Abl*. Bien que significatif, ce sauvetage n'est pas total, j'ai donc cherché à savoir si on pouvait améliorer ce sauvetage en étant hétérozygote mutant pour *htt* (**Figure 98**). Dans ce contexte on n'améliore pas le sauvetage du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*. À l'inverse, je montre aussi qu'on n'empêche pas le sauvetage du mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* si je surexprime en parallèle *htt* dans les MB.





**Figure 99 :** Représentation schématique du modèle proposé du fonctionnement de la voie de signalisation PCP pendant le développement des MB. Dans le lobe  $\alpha$ , le développement des branches axonales semble être sous le contrôle du récepteur FZ, qui une fois activé recrute DSH et potentiellement Rac1. Ces protéines contribuent à l'activation de la formine DAAM, impliquée dans la polymérisation du cytosquelette d'actine. Dans le lobe  $\beta$ , le récepteur VANG permet la croissance des branches axonales via une interaction indirecte avec le ligand Wnt5. Cette croissance passe de nouveau par le recrutement de DSH, Rac1 et DAAM. Schéma issu de l'article de Gombos *et al.* 2015.



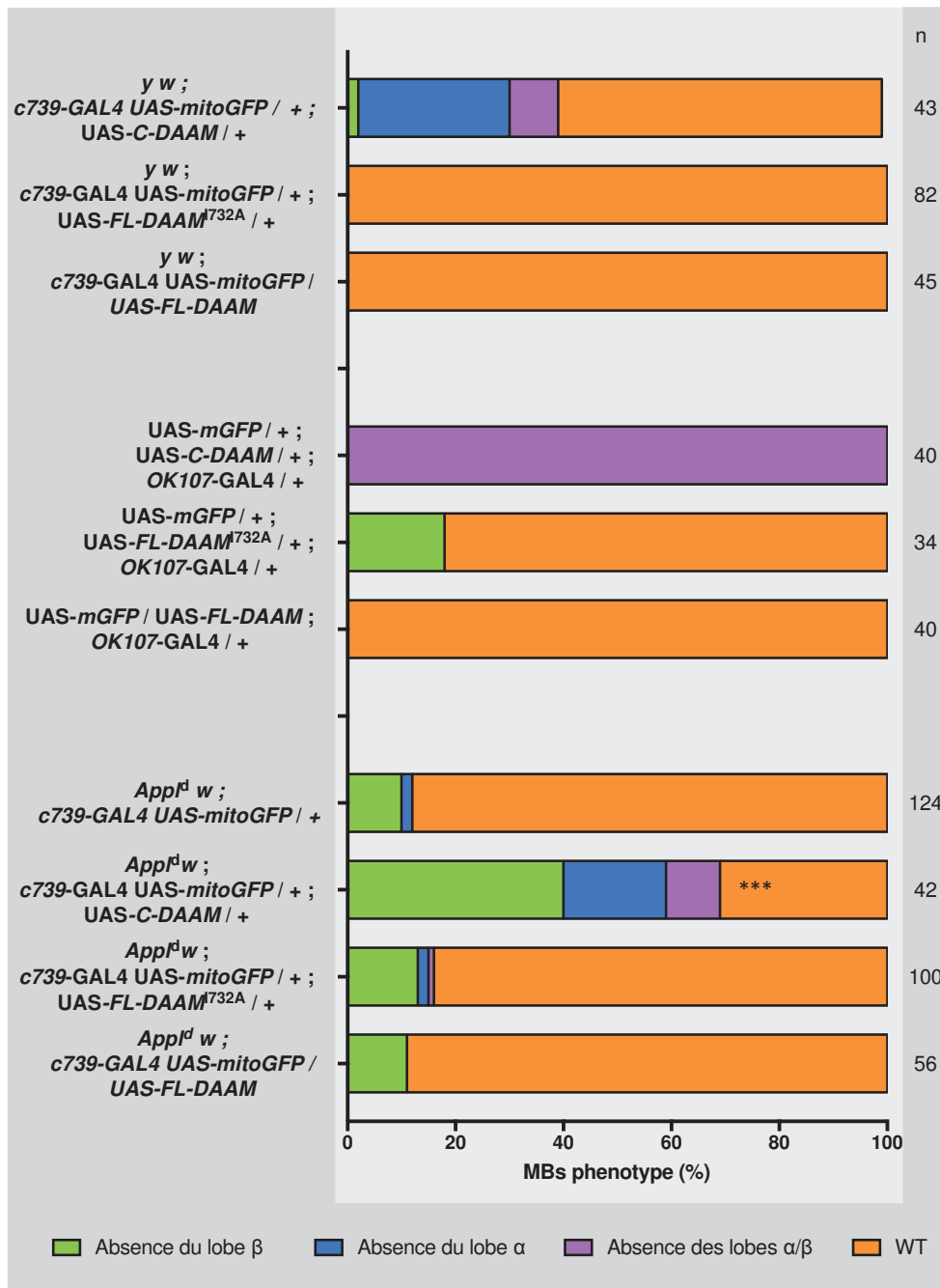
**Figure 100 :** Représentation schématique de la protéine DAAM et des formes mutantes de la protéine. La protéine contient différents domaines conservés : GBD (GTP-ase binding domain), DID (Diaphanous inhibitory domain), DD (Dimerization domain), CC (Coiled-coil region), FH1 (Formin homology domain 1), FH2 (Formin homology domain 2), DAD (Diaphanous autoinhibitory domain). La forme C-DAAM correspond à une délétion de la partie N-terminale jusqu'au domaine FH1. La forme FLDAAM I732A correspond à une mutation en position 732 d'une Ile en Ala. Schéma issu de l'article de Gombos *et al.* 2015.

#### 4.5 Le gène DAAM

Toujours dans l'optique de trouver des interacteurs moléculaires à la protéine APPL, nous avons décidé de travailler avec la protéine DAAM (Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis). DAAM est une protéine de type formine, initialement découverte pour son implication dans la voie PCP lors de l'embryogénèse chez le Xenope (Habas *et al.* 2001). Chez la drosophile, à l'inverse, l'équipe de Mihály a montré que la protéine DAAM n'interagissait avec la voie PCP que lors de la neurogénèse, et notamment le développement des neurones des MB, et non lors de la polarisation des tissus épithéliaux (Matusek *et al.* 2006 ; Gombos *et al.* 2015). En effet, différentes expériences génétiques suggèrent fortement que DAAM interagirait avec la protéine DSH afin d'assurer un assemblage correct du cytosquelette d'actine, facteur essentiel au développement des neurones des MB (**Figure 99**).

Suite à ces données, nous avons cherché à mettre en évidence une possible interaction génétique entre *Appl* et *DAAM*. Pour cela, nous avons supposé qu'une surexpression de la protéine DAAM sauvage (FLDAAM) permettrait de sauver le phénotype mutant *Appl<sup>d</sup>* (**Figure 101**). Toutefois, nous n'observons aucune modification du phénotype lors de la surexpression de DAAM avec la construction *c739-GAL4* dans un contexte *Appl<sup>d</sup>*.

En parallèle, j'ai observé l'effet de l'expression de deux différentes formes mutées pour DAAM : alors que la forme C-DAAM est délétée de son domaine N-terminal et notamment de sa fonction d'auto-inhibition, la forme FL-DAAM<sup>I732A</sup> produit la protéine entière avec une mutation en position 732 transformant une Isoleucine en Alanine affectant ainsi la fonction de DAAM dans l'assemblage du cytosquelette d'actine (**Figure 100**).

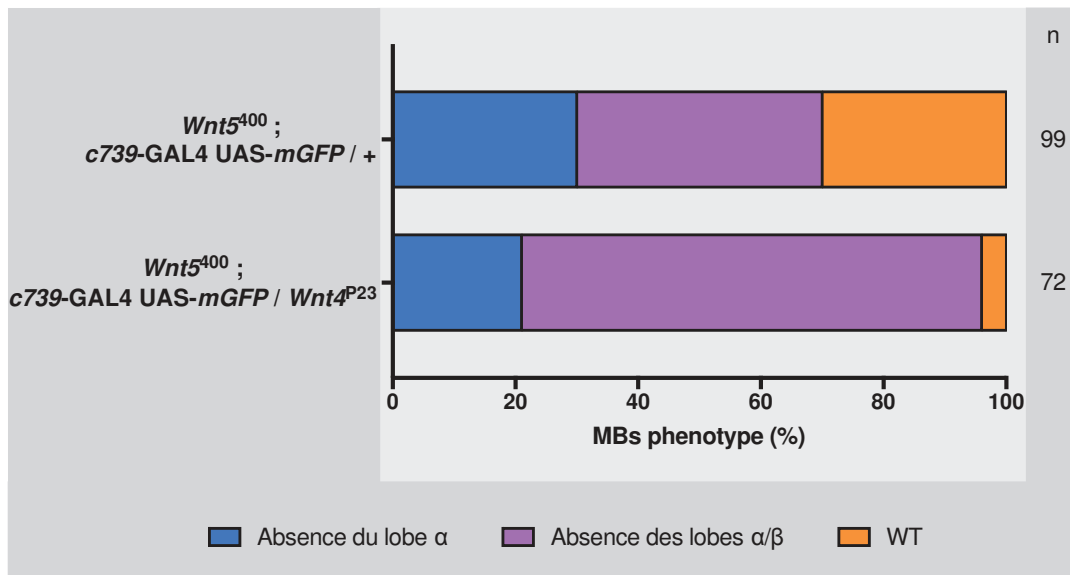


**Figure 101** : Analyse de l'expression des formes DAAM chez le mutant *App<sup>l</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype de MB sauvage : \*\*\*  $p < 0,001$ .

L'expression de la forme C-DAAM produit par elle-même un phénotype lorsque je l'exprime avec *c739*-GAL ou *OK107*-GAL4. Alors qu'avec *c739*, on observe majoritairement un effet sur le développement du lobe  $\alpha$  (environ 40% des MB), l'expression de cette forme avec *OK107* entraîne une perte des lobes  $\alpha$  et  $\beta$  dans 100% des cas (n=40). Cela démontre l'importance de la régulation de cette protéine. Si on surexprime cette forme C-DAAM avec *c739*-GAL4 dans un contexte mutant pour *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* on observe une augmentation du phénotype de perte du lobe  $\beta$  par rapport au mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>* seul. Enfin, l'expression de la forme FL-DAAM<sup>I732A</sup> avec *c739*-GAL4 ne produit aucun phénotype dans les MB, alors qu'avec *OK107*-GAL4, elle entraîne une perte du lobe  $\beta$  d'environ 20%. Cependant, lorsque j'exprime cette forme dans un contexte mutant *App<sup>l<sup>d</sup></sup>*, le phénotype de perte du lobe  $\beta$  n'est pas modifié (**Figure 101**).

L'ensemble de ces résultats démontrent que ces deux protéines agissent toutes deux dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ , mais ne confirme pas qu'elle puisse interagir dans la même voie.

Bien que DAAM soit une cible de DSH pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$ , d'autres protéines le sont aussi. Il est possible que l'activation de DSH par ABL sous le contrôle d'APPL, conduise préférentiellement à l'activation d'autre protéines que DAAM par DSH.



**Figure 102 :** Analyse des mutants *Wnt5*<sup>400</sup> et *Wnt4*<sup>P23</sup>. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

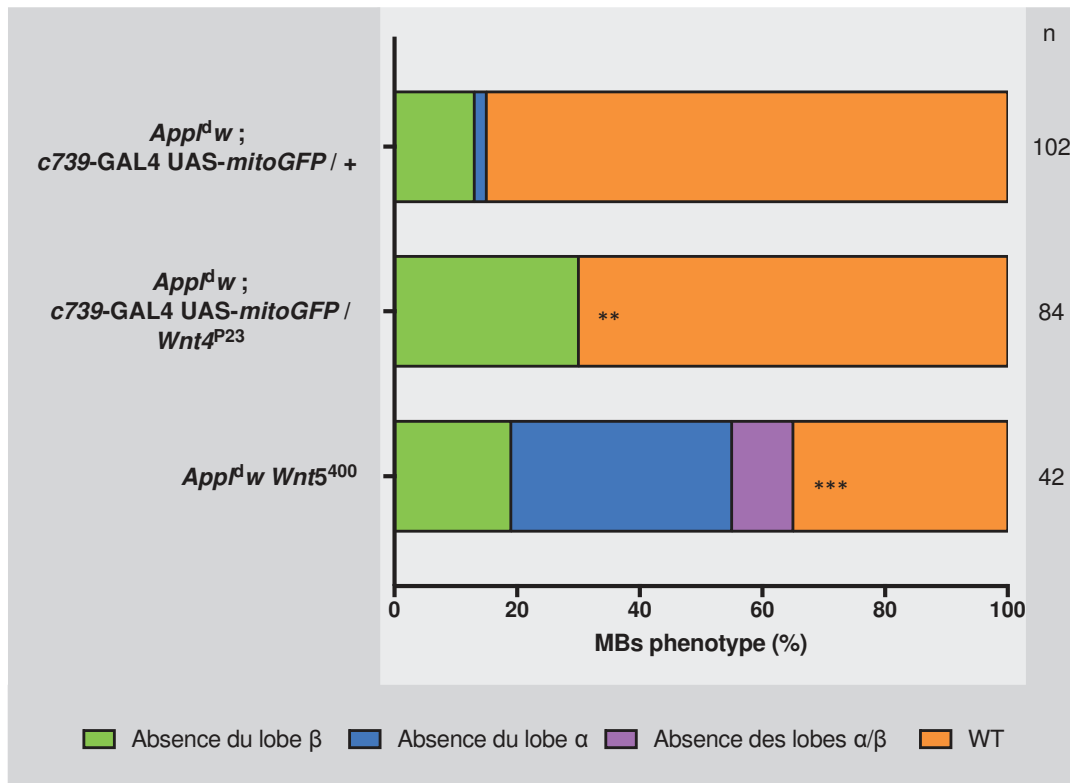
## 4.6 Les gènes *wnt4* et *wnt5*

### 4.6.1 Analyse des phénotypes mutants

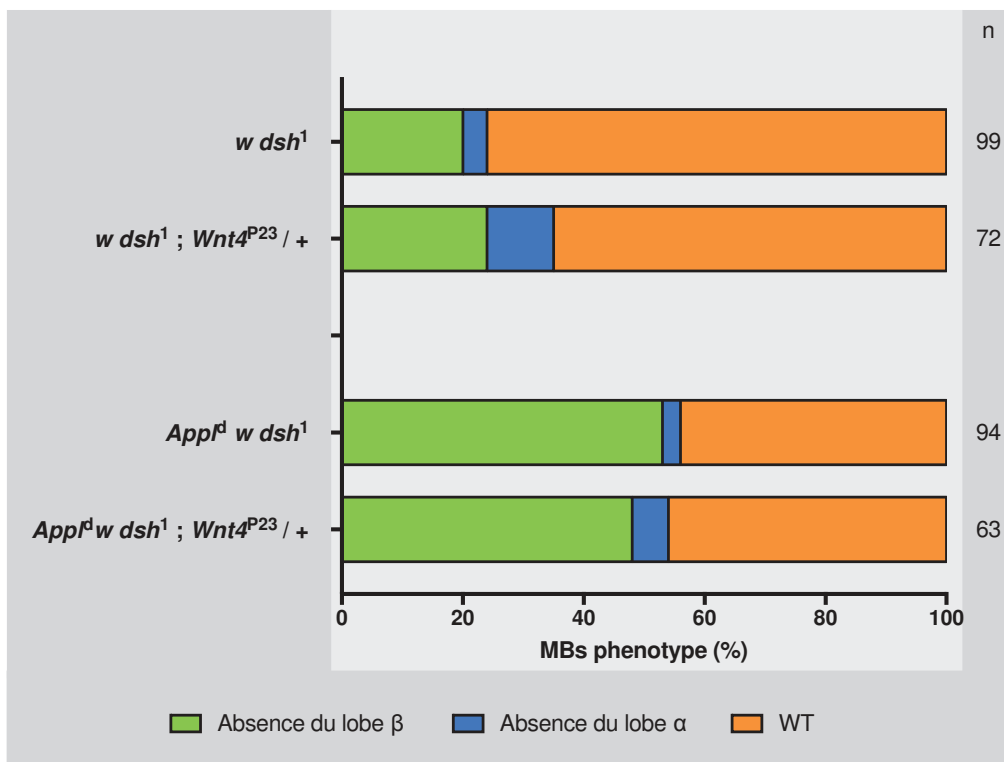
La fonction de co-récepteur d'APPL dans la voie PCP laissait supposer que son activation passait par une interaction avec son ligand. Il avait été déjà mis en évidence que le ligand de la protéine FZ est une protéine de la famille des WNT. Les Wnt sont des glycoprotéines sécrétées dans la matrice extracellulaire, pouvant se lier à des récepteurs transmembranaires, permettant ainsi l'activation de certaines voies de signalisation. Ces protéines sont très conservées au cours de l'évolution, et on en dénombre 7 chez la drosophile. L'étude Soldano *et al.* 2013 a pu avancer implicitement l'hypothèse que WNT5 pourrait être le ligand d'APPL.

Nous nous sommes focalisés sur WNT5 et WNT4, toutes deux interagissant avec FZ, afin de déterminer si l'une de ces protéines pouvait être le ligand de la voie PCP lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ .

J'ai tout d'abord analysé le phénotype du mutant *Wnt5*. Le gène *Wnt5* se situe sur le chromosome X. Nous travaillons avec l'allèle *Wnt5<sup>400</sup>* qui correspond à une délétion de la séquence codante de *Wnt5* comprenant l'ATG initiateur (Fradkin *et al.* 2004). Cet allèle est viable à l'état homozygote, ce qui nous permet d'observer des mâles hémizygotes pour la mutation. L'étude de Reynaud *et al.* 2015, produite dans notre équipe et à laquelle j'ai participé, a permis de démontrer la fonction de WNT5 dans le guidage des branches  $\alpha$  des neurones  $\alpha/\beta$ . Bien que le phénotype de perte du lobe  $\alpha$  soit prédominant chez les mutant *Wnt5<sup>400</sup>*, on observe toutefois que dans 40% des cas il y a aussi une perte du lobe  $\beta$ , laissant supposer un rôle de cette protéine dans le développement de ce lobe (**Figure 102**).



**Figure 103 :** Analyse de l'interaction génétique entre le mutant *AppI<sup>d</sup>* et les mutants *Wnt5<sup>400</sup>* et *Wnt4<sup>P23</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur la pénétrance de MB sauvage : \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .



**Figure 104 :** Analyse de l'interaction génétique entre les mutants *dsh<sup>1</sup>* et *AppI<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* et le mutant *Wnt4<sup>P23</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

L'absence de phénotype mutant complet pouvant être due à un effet de redondance entre les différents membres de la famille des Wnt, j'ai analysé l'effet d'un mutant *Wnt4* dans ce contexte génétique.

Le gène *Wnt4* est porté par le second chromosome. Nous travaillons avec l'allèle *Wnt4<sup>P23</sup>*, qui consiste en une délétion du premier exon et de l'ATG initiateur suite à une excision d'élément P (Sato *et al.* 2006).

La mutation *Wnt4<sup>P23</sup>* à l'état hétérozygote permet d'augmenter le phénotype du mutant hémizygotique *Wnt5<sup>400</sup>*, avec près de 80% des MB présentant une absence des lobes  $\alpha$  et  $\beta$  (**Figure 102**).

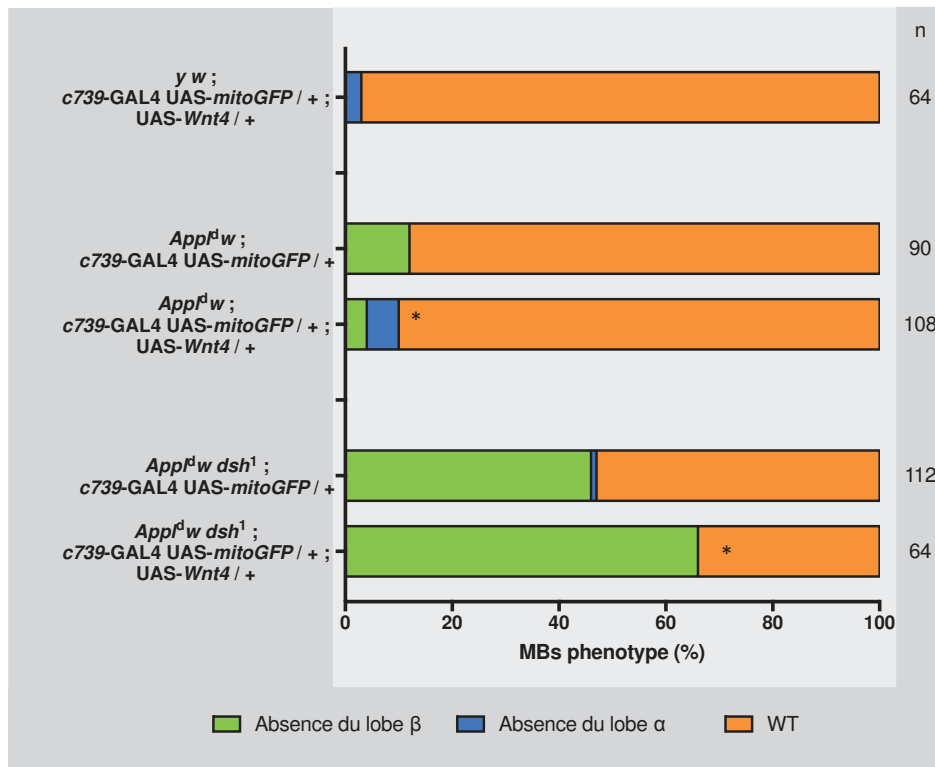
Cela nous permet de montrer d'une part que les WNT ont un rôle important dans le développement du lobe  $\beta$ , et d'autre part que la perte de fonction de *Wnt5* peut être compensé par un autre membre de la même famille et notamment *Wnt4*.

#### 4.6.2 Analyse des interactions génétiques entre *App1* et *Wnt5/4*

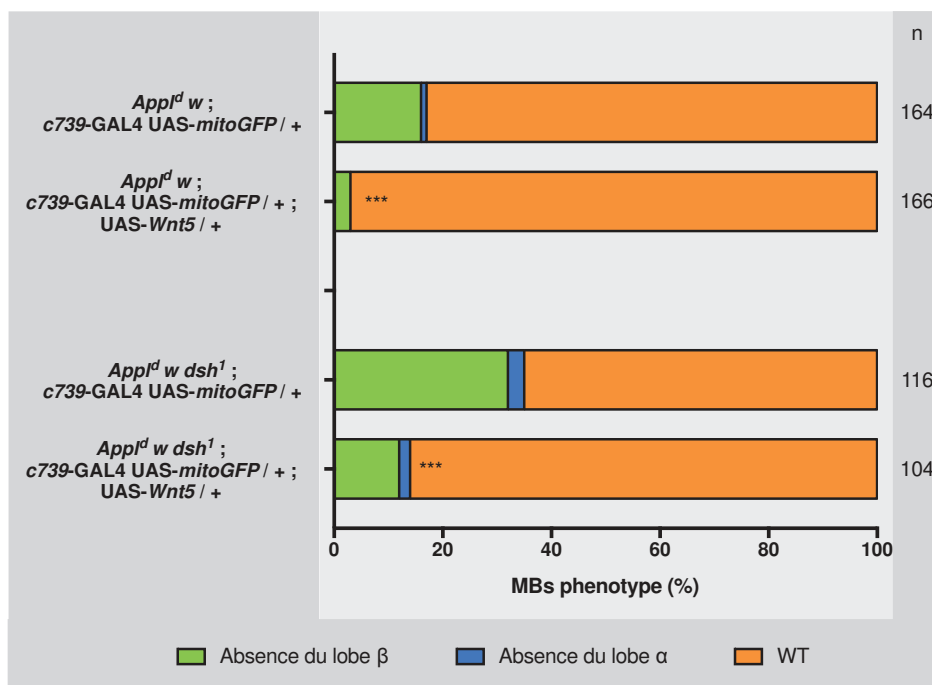
Je me suis ensuite intéressée à une interaction génétique entre *App1* et les gènes *Wnt5* et *Wnt4*. On peut ainsi voir que le phénotype de perte du lobe  $\beta$  du mutant *App1<sup>d</sup>* est significativement augmentée par la mutation hétérozygote *Wnt4<sup>P23</sup>* (**Figure 103**).

Afin d'étudier l'effet du mutant *Wnt5<sup>400</sup>* sur le mutant *App1<sup>d</sup>*, nous avons recombinié les deux mutations. L'analyse des mâles hémizygotiques *App1<sup>d</sup> w Wnt5<sup>400</sup>* nous permet d'observer un phénotype de perte du lobe  $\beta$  d'environ 20%, similaire à ce qu'on observe chez les mutants *App1<sup>d</sup>* seul. Toutefois dans ce contexte génétique, on observe un biais vers la perte du lobe  $\alpha$ .





**Figure 105 :** Analyse de la surexpression de *Wnt4* chez les mutants *App<sup>Δ</sup>w* et *App<sup>Δ</sup>w dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*  $p < 0,05$ .



**Figure 106 :** Analyse de la surexpression de *Wnt5* chez les mutants *App<sup>Δ</sup>w* et *App<sup>Δ</sup>w dsh<sup>1</sup>*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés. Test  $\chi^2$  sur le phénotype d'absence du lobe  $\beta$  : \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.6.3 Analyse des interactions génétiques entre la voie PCP et *Wnt4*

Afin de savoir si WNT4 peut être le ligand d'APPL dans la voie PCP, j'ai analysé l'interaction génétique entre le mutant *Wnt4*<sup>P23</sup> et les mutants *dsh*<sup>1</sup> et *Appl*<sup>d</sup> *w dsh*<sup>1</sup> (**Figure 104**). La perte de fonction partielle de *Wnt4* ne modifie ni le phénotype de perte du lobe  $\beta$  du mutant *dsh*<sup>1</sup>, ni celui du mutant *Appl*<sup>d</sup> *w dsh*<sup>1</sup>.

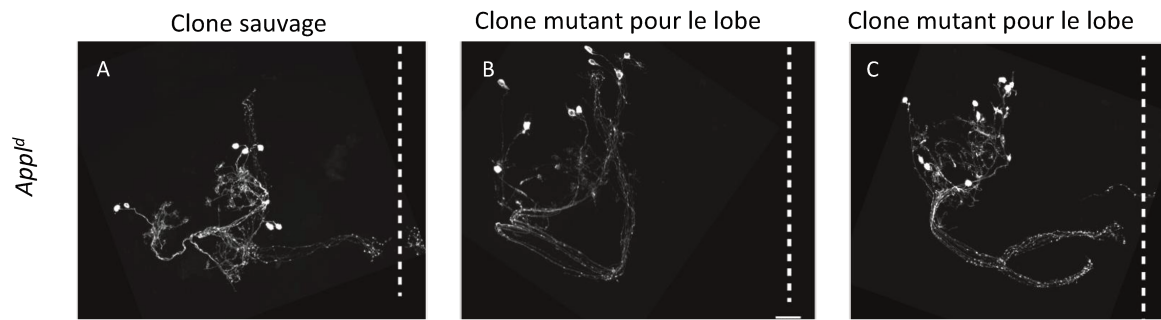
Il aurait été intéressant de pouvoir observer l'effet du mutant *Wnt5*<sup>400</sup> sur les mutants *dsh*<sup>1</sup> et *Appl*<sup>d</sup> *w dsh*<sup>1</sup>, mais pour cela il nous faudrait recombinaison ces trois allèles.

#### 4.6.4 Analyse du sauvetage du mutant *Appl*<sup>d</sup> par la surexpression de *Wnt4* ou *Wnt5*

Afin de pousser l'analyse de l'interaction génétique, j'ai observé l'effet de la surexpression *Wnt4* dans les neurones  $\alpha/\beta$  sur le mutant *Appl*<sup>d</sup> (**Figure 105**). On peut ainsi voir que dans cette condition, on observe un sauvetage significatif de la perte du lobe  $\beta$ . Toutefois, la surexpression de *Wnt4* dans un contexte mutant pour *Appl*<sup>d</sup> *w dsh*<sup>1</sup> entraîne cette fois-ci une augmentation significative du phénotype de perte du lobe  $\beta$ .

A l'inverse, lorsque je surexprime *Wnt5* dans les MB, dans un contexte *Appl*<sup>d</sup> ou *Appl*<sup>d</sup> *w dsh*<sup>1</sup>, je sauve, de façon significative dans les deux cas, la perte du lobe  $\beta$  (**Figure 106**). Cela confirme les résultats de sauvetage d'*Appl*<sup>d</sup> par *Wnt5*, obtenus dans l'étude de Soldano *et al.* 2013.

Au vu des résultats d'interaction génétiques obtenus entre *Wnt5* et la voie PCP, il semblerait que la protéine WNT5 puisse être le ligand qui active la voie lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Des expériences ont été réalisées dans l'équipe du Dr. Bassem Hassen définissant WNT5 comme le ligand d'APPL (Nicolas *et al.* soumis).



**Figure 107 : Clone MARCM de visualisation du mutant *App<sup>1d</sup>*.** Les clones ont été induits en pupes 48H suite à un choc thermique de 15 min à 37°C. On visualise ici une dizaine de neurones  $\alpha/\beta$  mutant pour *App<sup>1d</sup>*. (A) clone sauvage. (B) Clone avec défaut de croissance des branches axonales  $\beta$ . (C) Clone avec défaut de guidage des branches axonales  $\alpha$ .

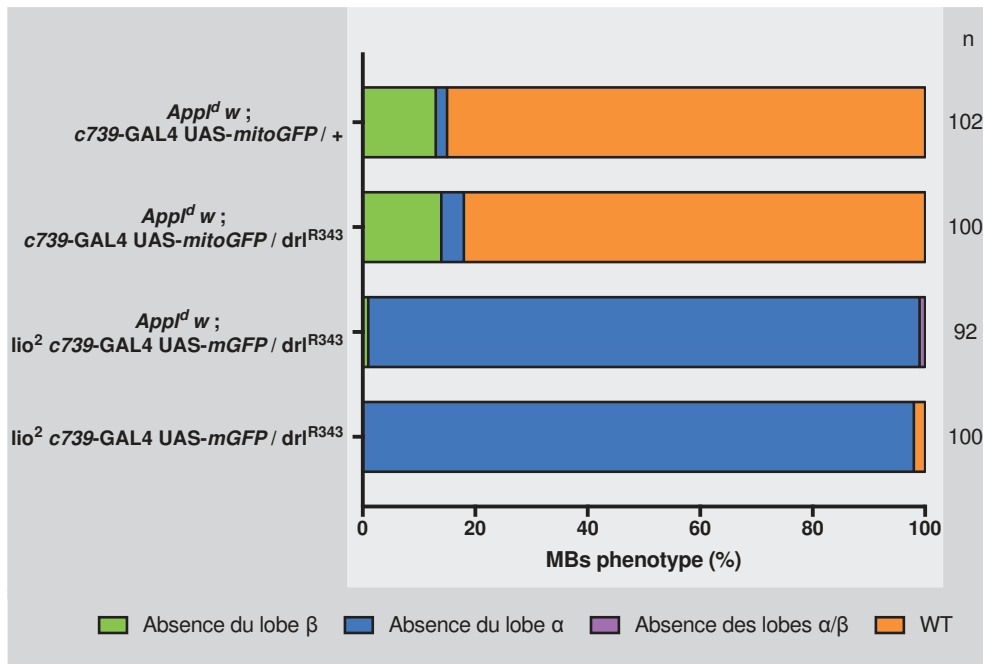
Indépendamment de ces résultats, il semblerait que APPL et WNT4 interagissent aussi au niveau des MB pendant le développement. On a pu voir que la perte de fonction partielle de *Wnt4* accentue le phénotype mutant d'*Appl<sup>d</sup>*. Toutefois, les résultats contradictoires obtenus avec la surexpression de *Wnt4* compliquent l'analyse de l'interaction génétique entre *Appl* et *Wnt4*. Cependant, au vu de ce qui a été obtenu, bien que ces deux gènes semblent interagir lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ , leur interaction ne semble pas corrélée à la fonction d'*Appl* dans la voie PCP.

#### 4.7 Les gènes *drl* et *Drl2*

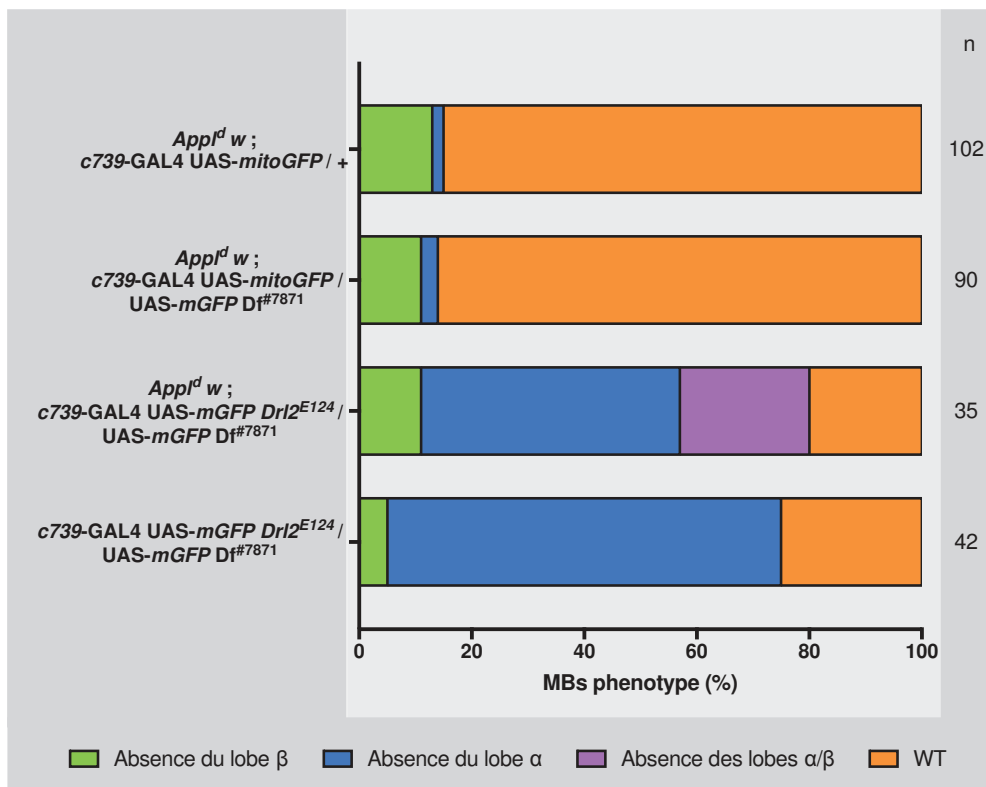
##### 4.7.1 Analyse de clones MARCM de visualisation *Appl<sup>d</sup>* affectant le développement du lobe $\alpha$

Les résultats préliminaires obtenus à partir des travaux de Michel Owusu, étudiant de master1, sous la supervision d'Elodie Reynaud ont permis d'émettre l'hypothèse que les défauts du lobe  $\alpha$  chez les mutants *Appl<sup>d</sup>* sont dus à un défaut de guidage des branches axonales qui composent ce lobe (**Figure 107**). Des clones MARCM de visualisation du mutant *Appl<sup>d</sup>* ont permis d'observer un défaut de guidage des axones  $\alpha$ . On peut voir que pour la dizaine de neurones marqués, les axones bifurquent correctement au niveau du point de branchement. Toutefois, les deux faisceaux d'axones poussent de façon parallèle en direction médiale.

Ces résultats démontrent qu'*Appl* agit différemment pour le développement des branches axonales  $\alpha$  et  $\beta$ . Alors qu'*Appl* agit sur la pousse des axones  $\beta$ , il semblerait qu'il agisse sur le guidage des axones  $\alpha$ .



**Figure 108 :** Analyse de l'interaction génétique entre *App1* et *drl*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.



**Figure 109 :** Analyse de l'interaction génétique entre *App1* et *Drl2*. L'effectif (n) correspond au nombre de MB observés.

Suite à ces résultats et à l'étude de Reynaud *et al.* 2015 menée au laboratoire qui démontre que les gènes *drl* et *Drl2* sont impliqués dans le guidage de la branche  $\alpha$  des neurones  $\alpha/\beta$ , nous avons cherché à déterminer si *App1* interagissait avec ces deux gènes lors du guidage de la branche  $\alpha$ .

#### 4.7.2 Analyse de l'interaction génétique entre *App1* et *drl*

La perte de fonction partielle de *drl* ne modifie pas le phénotype de perte du lobe  $\alpha$  du mutant *App1<sup>d</sup>* (**Figure 108**). La pénétrance du phénotype de perte du lobe  $\alpha$  du trans-hétérozygote *lio<sup>2</sup> / drl<sup>R343</sup>* étant presque complète (99% des MB), il est impossible de détecter une modification du phénotype avec le mutant *App1<sup>d</sup>*.

#### 4.7.3 Analyse de l'interaction génétique entre *App1* et *Drl2*

Tout comme précédemment, la perte de fonction partielle de *Drl2* ne modifie pas le phénotype de perte du lobe  $\alpha$  du mutant *App1<sup>d</sup>* (**Figure 109**). Toutefois, le phénotype du mutant trans hétérozygote *Drl2<sup>E124</sup> / Df<sup>#7871</sup>* est modifié lorsqu'on y associe la mutation *App1<sup>d</sup>*. Alors que le mutant *Drl2* ne présente majoritairement que des défauts touchant le lobe  $\alpha$  (75% des MB), l'association avec le mutant *App1<sup>d</sup>* induit aussi un défaut au niveau des lobes  $\alpha$  et  $\beta$  simultanément.

Des données de clones MARCM de visualisation ont permis de démontrer pour d'autres mutations, par exemple WNT5, que la perte des deux lobes était due à un défaut de guidage des axones  $\alpha$  et  $\beta$  (Reynaud *et al.* 2015). On peut donc supposer ici, que la perte à la fois de *Drl2* et d'*App1* puisse affecter dans une certaine mesure le guidage des axones  $\beta$ .



# Discussion

## **1. Régulation d'ABL par des protéines associées à des neurodégénérescences, APPL et HTT, pour le développement des MB dans le cerveau de drosophile**

Chez l'homme, les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Huntington ont été au centre de plusieurs milliers d'études au cours des dernières décennies. La compréhension et la mise au point de traitement contre ces pathologies restent encore un défi pour la recherche scientifique. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la protéine APP et le peptide A $\beta$  qui en dérive ont été clairement identifiés comme impliqués dans le développement de la pathologie. Il semblerait en effet que l'accumulation de ce peptide A $\beta$ , issu d'un déséquilibre dans le clivage d'APP dans le cerveau, soit à l'origine de la formation de plaques amyloïdes, caractéristiques majeures de la maladie, entraînant à terme une dégénérescence neuronale. Toutefois, différentes études ont avancé le fait que l'accumulation de ce peptide ne pouvait pas elle seule expliquer l'ensemble des défauts observés, et de nouvelles hypothèses ont été proposées parmi lesquelles la perte de fonction d'APP pourrait aussi participer au développement de la pathologie. On peut d'ailleurs noter que plus il y a de peptide A $\beta$ , moins la protéine complète APPL est présente. Il semble donc essentiel de déterminer les fonctions physiologiques de cette protéine. Cependant, chez la souris, l'étude de la fonction d'APP reste délicate et compliquée due à un effet de redondance fonctionnelle entre les différentes protéines APP, APLP1 et APLP2. A l'inverse, la drosophile a l'avantage de n'avoir qu'un seul homologue à la famille : APPL.

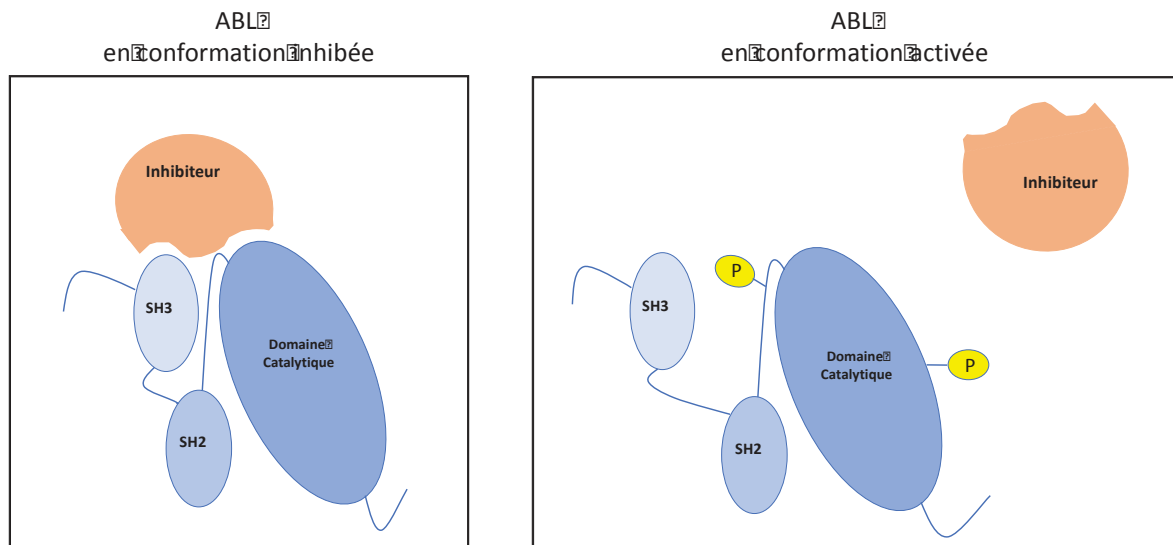




Les travaux de Soldano *et al.* 2013 ont permis d'avancer un rôle d'*Appl* dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB. En effet, ils ont pu mettre en évidence qu'APPL forme un complexe de récepteurs à la membrane avec FZ et VANG, tous deux membres de la voie PCP. APPL recrute la protéine kinase ABL, qui va phosphoryler la protéine cytoplasmique DSH, ce qui permet l'activation de la voie PCP. Cette étude a permis de démontrer qu'*Appl* agit de façon autonome cellulaire sur la croissance des branches axonales  $\beta$  des neurones  $\alpha/\beta$ . Il est intéressant de noter que ces neurones  $\alpha/\beta$  font partis de centre de la mémoire chez la drosophile, nous permettant de faire une analogie entre les fonctions des protéines APPL et APP au niveau de la mémoire.

Ce modèle fut notre point de départ dans la recherche de nouveaux gènes interagissant avec *Appl* au niveau de la voie PCP dans la pousse axonale, et nous a permis de détecter une interaction avec le gène *htt*. Ce gène code la protéine HTT, qui chez l'homme est impliquée dans la maladie de Huntington. C'est une maladie autosomique dominante, entraînant une neurodégénérescence progressive, caractérisée par des troubles psychiatriques, cognitifs et moteurs. Cette pathologie est causée par l'expansion anormale d'une séquence polyglutamine dans la région N-terminale de la protéine, qui provoque une agrégation de la protéine au niveau des neurones. Cependant, différentes études avancent aussi le fait que l'apparition de la maladie pourrait être imputable à la perte de la fonction physiologique de la protéine. Chez la drosophile, il existe un homologue au gène humain : le gène *htt*. La différence majeure entre ces deux homologues est l'absence de région polyglutamine dans la forme drosophile.

Dans cette étude je montre que les défauts de croissance dus au mutant *Appl<sup>d</sup>* sont sauvés par la perte de fonction partielle du gène *htt*, dévoilant un effet de régulation négatif d'*htt* sur la voie PCP. Nous avons pu mettre en évidence que, lors du développement des



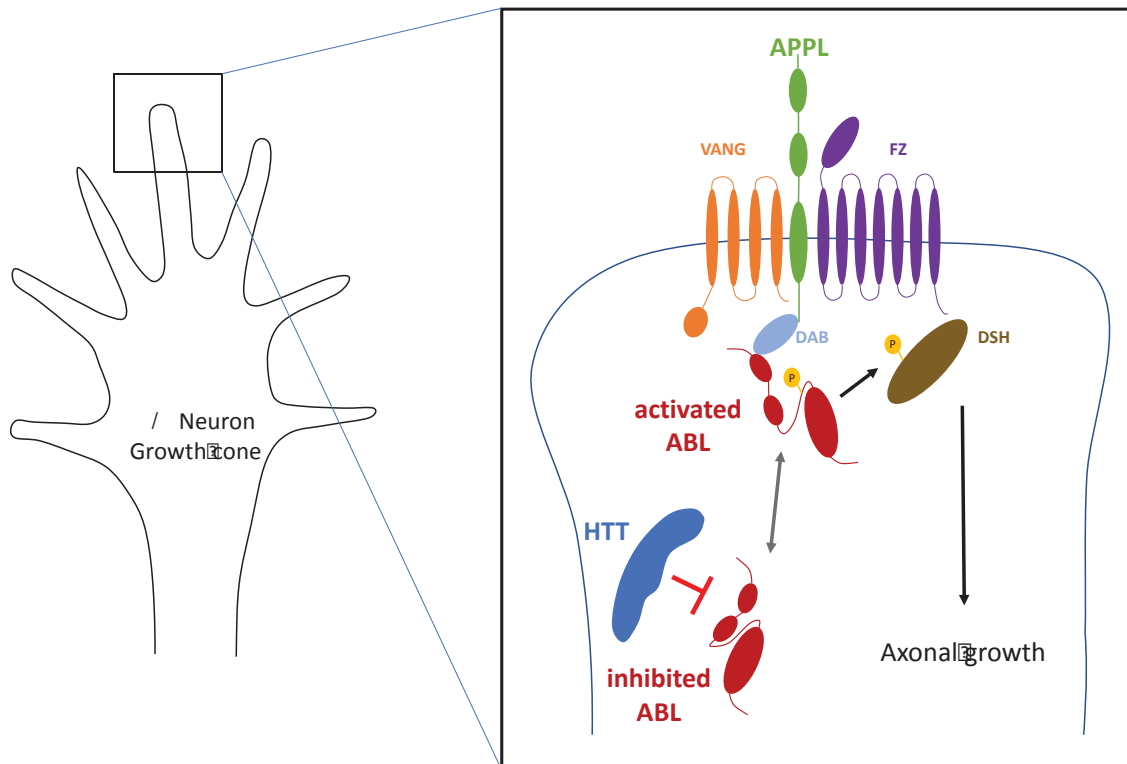
**Figure 110 : Régulation de l'activité d'ABL par interaction avec un inhibiteur.** Représentation schématique de l'inhibition d'ABL. Les domaines SH3 et kinase sont connectés, empêchant la phosphorylation de la protéine. La libération d'ABL de son inhibiteur permet la phosphorylation d'ABL, impliquant l'activation de son activité kinase.

neurones  $\alpha/\beta$ , la protéine kinase ABL joue un rôle essentiel, puisqu'aussi bien sa perte que son gain de fonction produisent des défauts dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Cette étude démontre que la protéine HTT n'affecte ni le transport, ni l'expression d'ABL, mais participe à la régulation négative du niveau de phosphorylation de la protéine.

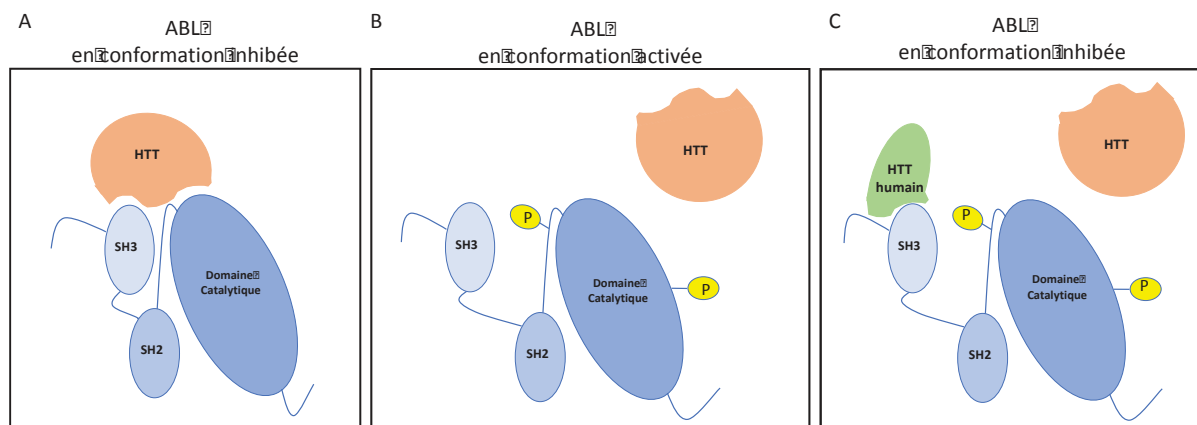
Etant établi que l'activité kinase de la protéine est directement corrélée à son niveau de phosphorylation (Dorey *et al.* 2001), nous pouvons avancer que la protéine HTT régule négativement l'activité kinase de la protéine lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Cette hypothèse est en cours de validation, grâce à des expériences, menées au sein du laboratoire, permettant de mesurer l'activité kinase d'ABL. Grâce à l'expression d'une sonde biosensor (CFP-YFP FRET) nous pouvons suivre directement *in vivo* l'activité kinase d'ABL dans les MB (Kannan *et al.* 2017).

L'expression de cette sonde biosensor dans les MB dans un contexte mutant pour *htt* nous a permis de voir une augmentation significative du signal FRET, donc de l'activité kinase d'ABL à l'âge adulte et pendant le développement au stade larvaire L3 (Communication Personnelle de Germain U. Busto). Ces résultats valident *in vivo* l'effet d'*htt* sur la régulation de l'activité kinase d'ABL. Toutefois, ils n'expliquent pas comment HTT permet cette régulation.

Différentes études ont montré que la régulation négative d'ABL pouvait être assurée grâce à un inhibiteur qui maintient la protéine dans une conformation inhibée, où le domaine SH3 interagit avec le domaine kinase (Barilà *et al.* 1998 ; Pluk *et al.* 2002 ; Wen & Van Etten 1997) (**Figure 110**). Une hypothèse serait que la protéine HTT serait un inhibiteur direct d'ABL et empêcherait la phosphorylation de la protéine. Des expériences de co-immunoprécipitation *in vitro* et *in vivo* sont en cours, afin de valider cette hypothèse.



**Figure 111 : Régulation de l'activité d'ABL au niveau du cône de croissance pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$  de MB.** Représentation schématique du modèle proposé. Au niveau du cône de croissance, ABL alterne entre un état activé via son recrutement/activation par les protéines APPL et DAB (*Disabled*), et un état inhibé via la protéine HTT. L'activation d'ABL lui permet de phosphoryler la protéine DSH et ainsi d'activer la voie PCP, permettant la croissance axonale. Toutefois, afin d'éviter une suractivité d'ABL néfaste pour le développement, cette dernière est régulée négativement par la protéine HTT.



**Figure 112 : Régulation de l'activité d'ABL par interaction avec un inhibiteur.** Représentation schématique de l'inhibition d'ABL. (A). Les domaines SH3 et SH2 sont connectés, empêchant la phosphorylation de la protéine. (B). La libération d'ABL de son inhibiteur permet la phosphorylation d'ABL, impliquant l'activation de son activité kinase. (C). La fixation d'un fragment humain de la protéine HTT sur un des sites de fixation d'ABL empêche la protéine HTT endogène de venir se fixer sur ABL. Le fragment humain ne pouvant pas fixer le deuxième site de fixation d'ABL est incapable d'assurer une inhibition correcte d'ABL.

Toutefois, il serait possible qu'HTT participe au transport de l'inhibiteur d'ABL dans les neurones  $\alpha/\beta$ , ce qui expliquerait que lorsque on est mutant pour *htt*, l'inhibiteur n'est plus amené vers ABL, et ne peut donc plus l'inhiber.

Ainsi lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ , la protéine ABL alternerait entre une conformation active et inhibée. Alors que la protéine HTT favoriserait directement ou indirectement l'inhibition de la protéine, la protéine APPL permettrait, elle, l'activation de la protéine, menant au final à la phosphorylation de DSH et l'activation de la voie PCP (**Figure 111**).

Les expériences d'interaction génétique entre *App1* et *htt* humain nous ont permis de voir que l'expression des différents fragments de la partie N-terminale de la protéine HTT peut sauver le phénotype de perte du lobe  $\beta$  dû à *App1<sup>d</sup>*. Cela signifie que la perte de *htt* endogène ou l'expression d'un fragment de la protéine humaine entraîne le même effet. Cela suppose un effet dominant négatif de la protéine humaine sur la protéine endogène HTT de drosophile. Ce fragment humain empêcherait la protéine endogène de fonctionner correctement en prenant sa place, sans pour autant pouvoir assurer la même fonction. Ainsi, en supposant qu'HTT régulerait ABL en interaction directe, on peut penser que le fragment humain pourrait se fixer sur seulement un des sites de régulation, et serait donc incapable de maintenir une conformation inhibée de la protéine, où les deux sites doivent être bloqués (**Figure 112**). Dans ces expériences, j'ai exprimé des fragments d'*htt* exprimant les 67, 171 ou 548 premiers acides aminés, tous trois sauvant significativement le phénotype de perte du lobe  $\beta$ , ce qui suppose qu'un site de fixation à ABL se trouve dans cette région de la protéine.

De plus, ces résultats démontrent une conservation fonctionnelle entre les protéines drosophiles et humaines. Une étude récente faite chez le rat et la souris démontre que les extraits de cerveau provenant d'animaux atteints de la maladie d'Huntington présentent une



augmentation du niveau de phosphorylation de la Sphingosine Kinase 2 (SK2) sans pour autant observer une augmentation de la quantité totale de protéine (Moruno-Manchon *et al.* 2017).

Les résultats de cette étude chez les mammifères associés à ceux que nous avons obtenus chez la drosophile soutiendraient l'hypothèse qu'une des fonctions physiologiques de la protéine HTT chez les mammifères comme chez la drosophile pourrait être de réguler négativement l'activité de certaine kinase dans le système nerveux.

## **2. Collaboration entre *Appl* et *arm* via sa fonction dans les jonctions adhérentes pour le développement des neurones**

Les voies de signalisation des Wnt sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques au cours du développement. Elles ont toutes comme point commun d'être activées par la fixation des protéines Wnt, ligands sécrétés, sur les récepteurs transmembranaires. Parmi les différentes voies existantes, nous nous sommes intéressés à deux d'entre elles : la voie canonique Wnt/Wingless et la voie non canonique PCP. Alors que la première permet de réguler le niveau de la protéine  $\beta$ -caténine dans la cellule via le recrutement de DSH, la seconde agit sur le niveau de phosphorylation de la protéine DSH, menant à l'activation de différents effecteurs cellulaires (**Figure 11-Figure 18**).

Il est intéressant de noter que ces deux voies partagent des interacteurs communs, tels que DSH, mais aussi FZ. On est donc en droit de se demander comment chacune de ses voies peut s'activer de façon individuelle et spécifique. L'équipe du Dr. Mlodzik avait émis l'hypothèse que la protéine ABL pourrait être impliquée dans ce mécanisme. Ainsi, par son action, ABL permettrait d'activer spécifiquement DSH vers la voie Wnt/Wingless ou vers la





voie PCP (Singh *et al.* 2010). Toutefois, le récepteur permettant l'activation de l'activité kinase n'était pas encore identifié au moment de cette étude.

Suite à l'étude dirigée par le Dr. Hassan, la protéine APPL a été décrite comme étant un récepteur de la voie PCP permettant le recrutement et l'activation d'ABL pendant la croissance des neurones  $\alpha/\beta$  des MB (Soldano *et al.* 2013).

Fort de ces différentes données, nous avons posé la question d'une possible interaction entre les voies PCP et Wnt/Wingless lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB, via les protéines ABL et APPL.

Afin d'établir une éventuelle interaction entre la voie Wnt et *Appl* pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$ , j'ai cherché à déterminer s'il y avait une interaction génétique entre *Appl* et *arm* (membre de la voie Wnt). J'ai ainsi démontré que la surexpression d'*arm* permettait de sauver le phénotype du mutant *Appl<sup>d</sup>*, alors que la perte de fonction d'*arm* l'augmentait (**Figure 49-50**).

Bien que les protéines ARM et APPL semblent interagir ensemble lors du développement des MB, cette interaction est apparue comme étant indépendante de la voie PCP, puisqu'à l'inverse nous n'observons aucune interaction entre *arm* et une forme mutée de *dsh* pour la voie PCP (**Figure 51**).

De ces résultats, nous pouvons avancer que la fonction d'APPL dans les neurones  $\alpha/\beta$  n'est pas restreinte exclusivement à la voie PCP. Il semble ainsi très probable qu'APPL intervienne dans une autre voie de signalisation, dans laquelle *arm* serait aussi impliquée.

La protéine ARM est impliquée dans deux voies de signalisation cellulaires majeures : la voie Wnt/Wingless et les jonctions adhérentes. Nous avons cherché à confirmer auprès de laquelle de ces deux voies, la protéine APPL interagissait avec ARM. Grâce à l'expression de

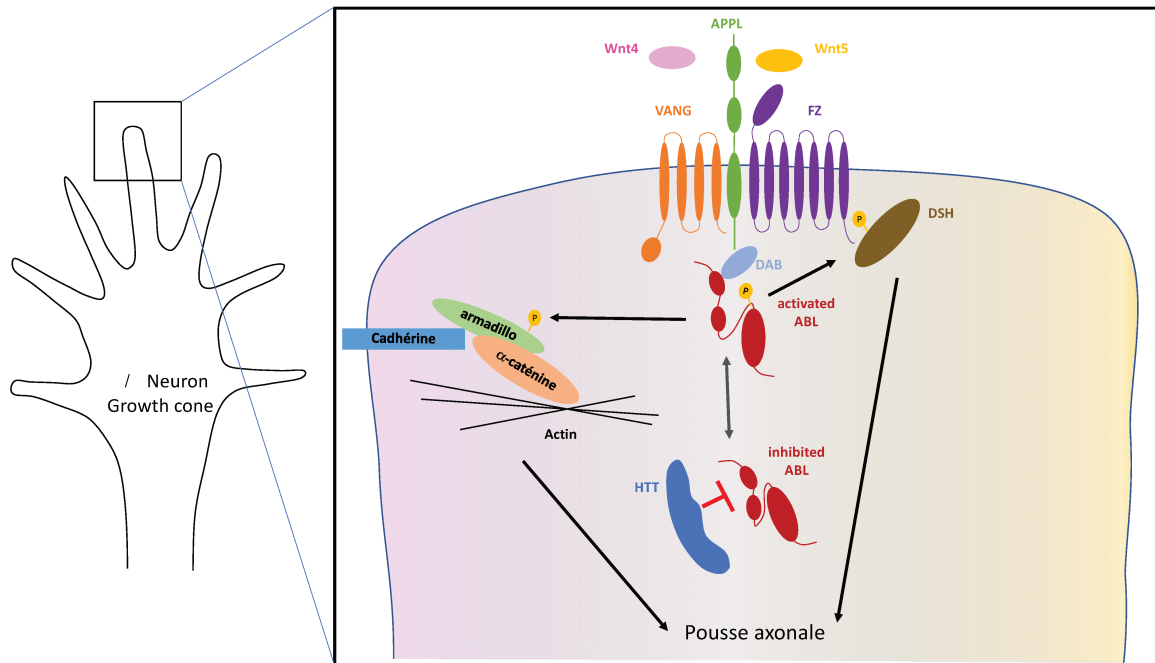


différentes constructions d'ARM affectant l'une ou l'autre de ces voies, nous avons pu mettre en évidence une interaction d'*Appl* avec la fonction d'*arm* dans les jonctions adhérentes (**Figure 55**).

Etant au niveau du système nerveux, et non d'un épithélium, il est surprenant d'imaginer l'implication des jonctions adhérentes pendant la croissance axonale. Dans ce modèle, la  $\beta$ -caténine, via probablement son interaction à l' $\alpha$ -caténine et la cadhérine, aurait plutôt pour rôle de réguler la dynamique du cytosquelette d'actine, élément essentiel à la croissance axonale lors du développement neuronal.

L'étude de Tamada *et al.* 2012 a permis de mettre en avant le rôle de la protéine ABL dans la régulation dynamique des jonctions adhérentes, via la phosphorylation de la protéine ARM. Lors du développement des neurones  $\alpha/\beta$ , ABL pourrait conserver cette fonction kinase sur ARM. De plus, cette activité kinase d'ABL sur ARM pourrait être aussi régulée par la protéine APPL, comme elle l'est déjà au niveau de la voie PCP. Ainsi lorsqu'APPL est activée, la protéine ABL est recrutée/activée lui permettant de venir phosphoryler soit la protéine DSH activant la voie PCP, soit la protéine ARM impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Les deux voies permettant au final d'agir positivement sur la croissance axonale.

Comment expliquer que la protéine APPL puisse moduler l'activité d'ABL vers l'une ou l'autre des deux voies. Une explication pourrait être que l'activité d'APPL serait ligand dépendant. En effet j'ai démontré que la surexpression des protéines WNT5 comme WNT4 pouvait sauver le phénotype de perte du lobe  $\beta$  (**Figure 105-106**). Toutefois, alors que la protéine WNT5 interagit avec la voie PCP, WNT4 en est incapable. A défaut, j'ai même pu observer que la surexpression de *Wnt4* dans un contexte *Appl<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* entraîne une augmentation du phénotype mutant. On pourrait imaginer que dans cette situation, la surexpression de WNT4 empêche la fixation de WNT5 au complexe protéique membranaire,



**Figure 113 : Activation des voies de signalisation par APPL dépendante du ligand Wnt.** Au niveau du cône de croissance, l'activation du complexe de récepteurs APPL/FZ/VANG par WNT5 permet le recrutement/activation d'ABL, afin de phosphoryler DSH. L'activation d'APPL par WNT4 permet le recrutement/activation d'ABL afin de venir consolider le complexe entre ARM, l' $\alpha$ -caténine et le cytosquelette d'actine. Les deux voies se complètent et permettent toutes deux d'assurer la croissance axonale des neurones  $\alpha/\beta$  des MB.

et donc réduirait l'activation de la voie PCP.

Ainsi d'une part, la fixation de WNT5 au complexe protéique APPL/FZ/VANG permettrait d'orienter l'activité d'ABL vers la phosphorylation de DSH et donc vers l'activation de la voie PCP, alors que d'autre part, la fixation de WNT4 permettrait, elle, d'orienter l'activité d'ABL vers la phosphorylation d'ARM et donc vers une régulation dynamique du cytosquelette d'actine (**Figure 113**).

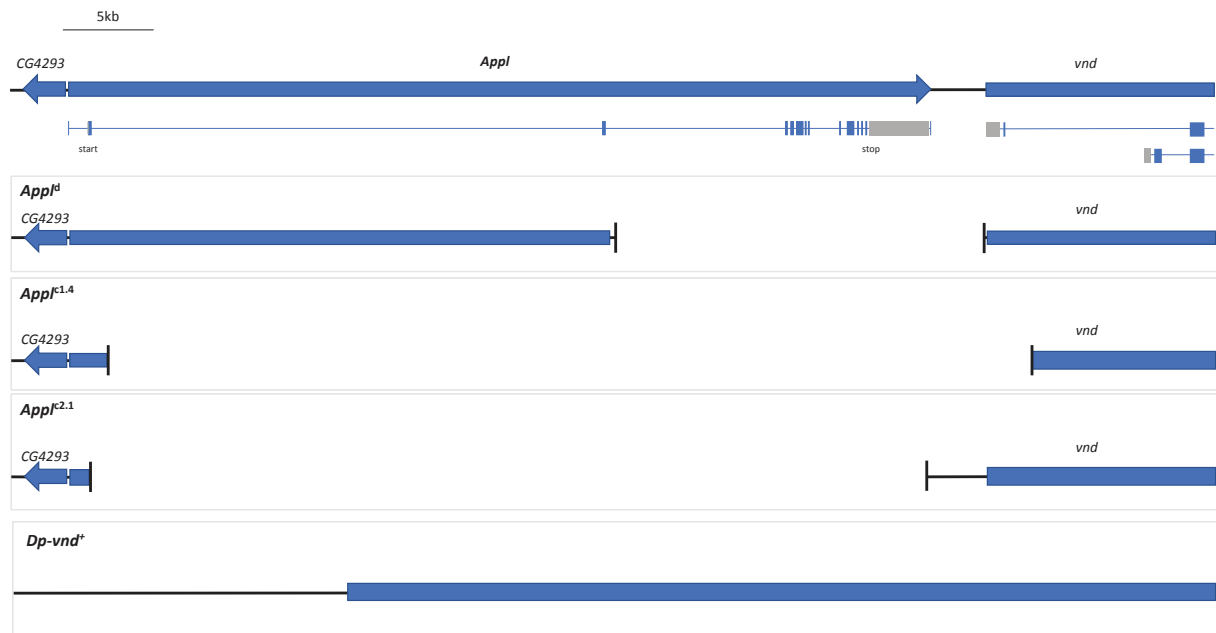
Ces deux voies de signalisation participeraient au développement correct des neurones  $\alpha/\beta$  des MB.

### **3. Création de nouveaux allèles mutants *App1* par la technique du CRISPR-Cas9**

L'analyse phénotypique de l'allèle mutant *App1<sup>d</sup>* révèle des problèmes dans la pénétrance du phénotype. Nous avons ainsi pu déterminer une différence du phénotype lorsqu'on se trouve en femelle homozygote ou en mâle hémizyote. De la même façon, une modification du bruit de fond génétique affecte le phénotype de façon importante, pouvant faire disparaître totalement le phénotype de perte du lobe  $\beta$  des neurones  $\alpha/\beta$ .

Ces résultats peuvent être dus à différents phénomènes. L'un d'entre eux pourrait être la façon dont cet allèle a été généré. En effet, cet allèle résulte de la fusion d'une délétion du chromosome X et d'une duplication sur le chromosome Y. Après avoir délimité les extrémités de cette mutation, j'ai pu mettre en évidence que seul les deux premiers exons du gène *App1* sont toujours présents. La délétion inclut aussi la région intergénique entre *App1* et *vnd*.

Nous avons donc entrepris de créer un nouvel allèle mutant nul pour *App1*, grâce la technique du CRISPR-Cas9. Nous avons obtenu deux allèles, l'un excisant uniquement la



**Figure 114 :** Représentation schématique des différents allèles mutants déjà existants et obtenus : *Appl<sup>d</sup>*, *Appl<sup>c1.4</sup>*, *Appl<sup>c2.1</sup>* et de la duplication *vnd*.

séquence codante d'*App1* : *App1<sup>c2.1</sup>*, et l'autre excisant *App1* et une partie du gène suivant *vnd* : *App1<sup>c1.4</sup>*. L'étude phénotypique des MB de ces deux gènes a produit des résultats surprenants. Alors que le mutant *App1<sup>c1.4</sup>* produit un phénotype de perte du lobe  $\beta$  avec une pénétrance plus grande que celle observée chez le mutant *App1<sup>d</sup>*, le mutant *App1<sup>c2.1</sup>* ne produit quant à lui aucun phénotype au niveau du développement des neurones  $\alpha/\beta$  des MB.

Une analyse moléculaire comparative des trois allèles mutants *App1<sup>d</sup>*, *App1<sup>c1.4</sup>*, *App1<sup>c2.1</sup>* dévoilent que le mutant *App1<sup>c2.1</sup>* est le seul pour qui la région intergénique avec *vnd* n'est pas affectée. De plus, les expériences d'interaction génétique entre *App1* et *vnd* ont montré que la duplication de *vnd* pouvait sauver le phénotype de perte de lobe  $\beta$ . Cependant, cette duplication comprend une partie du gène *App1* (**Figure 114**), nous sommes donc en train de réaliser des contrôles sur l'expression d'*App1* avec cette duplication. En effet, bien que cette duplication n'exprime pas l'ATG initiateur d'*App1*, il se pourrait qu'une partie de la protéine APPL soit produite, ce qui pourrait expliquer le sauvetage des mutants avec cette construction.

Ces données nous laissent penser que *vnd* est aussi impliqué dans le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . Le gène *vnd* code un facteur de transcription connu pour être impliqué dans la formation de la corde nerveuse chez l'embryon, ce qui explique que chacune des mutations connues de *vnd* soit létale dès le stade embryonnaire (Jiménez *et al.* 1995). Toutefois, l'étude de Stepchenko *et al.* 2011 a démontré qu'au stade embryonnaire seul le transcrit A de *vnd* est exprimé. Le transcrit B est quant à lui exprimé à partir du stade larvaire jusque chez l'adulte, supposant d'autres fonctions pour *vnd* pendant le développement.

Il est intéressant de noter que chez le mutant *App1<sup>c1.4</sup>* ce sont le codon initiateur et le premier exon du transcrit B de *vnd* qui sont absents. On peut supposer que c'est la perte





simultanée d'*App1* et de ce transcrit de *vnd* qui produit ce phénotype de 40% de perte du lobe  $\beta$  lors du développement des MB.

Bien que le mutant *App1<sup>d</sup>* n'affecte pas directement la séquence de *vnd*, il est fort probable qu'il affecte son niveau de transcription. En effet, la région intergénique entre *App1* et *vnd* présente différents sites de régulation de la transcription de *vnd* (Stepchenko *et al.* 2011). Cette région étant absente dans le mutant *App1<sup>d</sup>*, il est probable que la régulation du gène en soit affectée.

Cela pourrait expliquer la différence de phénotype entre les mutants *App1<sup>c1.4</sup>* et *App1<sup>d</sup>* (respectivement 40% et 15% de perte du lobe  $\beta$ ). Alors qu'avec le mutant *App1<sup>c1.4</sup>*, la transcription du transcrit B de *vnd* serait absente, pour le mutant *App1<sup>d</sup>*, elle ne serait que diminuée. Cette hypothèse est en cours de vérification grâce à des expériences qRT-PCR au laboratoire.

Enfin, avec le mutant *App1<sup>c2.1</sup>*, le gène *vnd* et la région intergénique sont intacts. La perte du gène *App1* seul n'est donc pas suffisant pour induire un phénotype au niveau des MB.

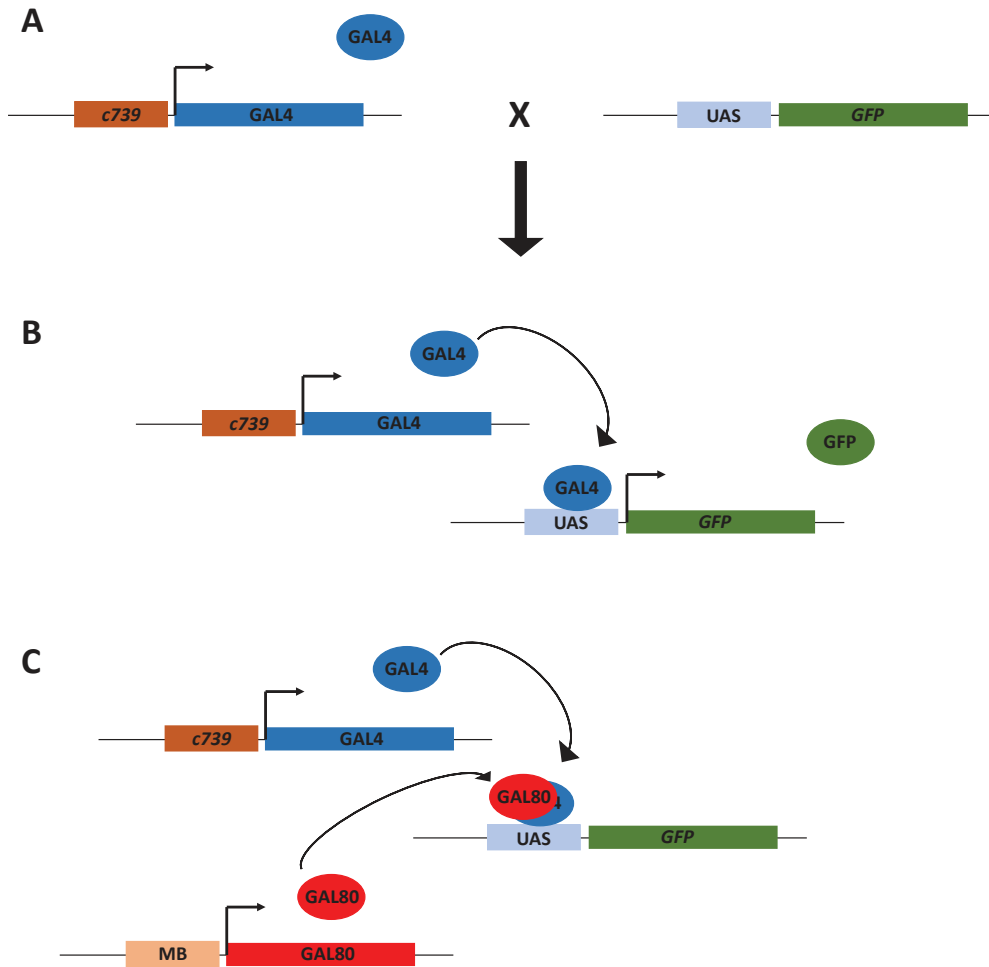
Il est essentiel de rappeler que le rôle d'*App1* pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$  a été validé moléculairement et génétiquement. En effet, Soldano *et al.* 2013 ont démontré grâce à des expériences de co-immunoprécipitation en cellules et d'interactions génétiques *in vivo* que les protéines APPL, VANG et FZ interagissaient ensemble. De plus, ils ont démontré que le phénotype du mutant *App1<sup>d</sup>* est significativement sauvés par la surexpression d'*App1* spécifiquement dans les neurones  $\alpha/\beta$ . J'ai pu confirmer ce sauvetage de la surexpression d'*App1* chez le mutant *App1<sup>d</sup> dsh<sup>1</sup>* (**Figure 87**). Enfin, j'ai aussi pu démontrer que ce sauvetage était maintenu lorsque j'exprime l'homologue humain APP dans les MB. Tout ceci démontre le rôle de la protéine au niveau des neurones  $\alpha/\beta$ .



Il est important de déterminer le rôle exact de *vnd* lors du développement des MB. Les allèles mutants existant de ce gène sont tous létaux à l'état homozygote. Ces mutations affectent les deux transcrits de *vnd*, toutefois, le transcrit A étant le seul à être exprimé chez l'embryon (Stepchenko *et al.* 2011), on peut supposer que la létalité embryonnaire est due à la perte de ce transcrit.

Afin d'étudier la fonction de *vnd* pendant le développement des MB, nous proposons donc de créer un nouvel allèle mutant, grâce à la technique du CRISPR-Cas9 afin d'exciser uniquement la région intergénique entre *Appl* et *vnd* et/ou le premier exon du transcrit B, sans altérer la séquence du transcrit A. Le phénotype de ce nouveau mutant nous donnera potentiellement des informations importantes sur la fonction de *vnd* dans les MB. Nous pouvons aussi réaliser des clones MARCM canoniques des mutants *vnd* existants. Ainsi le développement ne serait pas affecté, et nous pourrions déterminer si ce gène agit de façon autonome cellulaire lors du développement des MB.

Pour conclure, en supposant que *vnd* participe bien au développement des MB, cela signifierait que deux gènes voisins interagiraient ensemble, potentiellement dans la même voie de signalisation pendant le développement des neurones  $\alpha/\beta$ . On peut imaginer que la protéine APPL en tant que récepteur se trouverait au début de la voie de signalisation, alors que *vnd*, en tant que facteur de transcription, se trouverait en fin de voie de signalisation.



**Figure 113 : Le système UAS/GAL4.** (A). Dans les individus n'exprimant que l'UAS-GFP, il n'y a pas d'expression de la GFP. Dans les individus exprimant *c739*-GAL4, il y a production du GAL4 dans les neurones ou le promoteur de *c739* est actif. (B). La descendance issue du croisement de ces deux individus produit le GAL4 dans les neurones, qui reconnaît les séquences UAS, ce qui active la transcription de la GFP. (C). L'expression du GAL80 inhibe l'activité du GAL4. Le GAL80 est exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique des MB. En combinant les constructions GAL4 et GAL80, on empêche la production de la GFP spécifiquement dans les MB.

# Matériels et méthodes

## 1. Souches et croisements

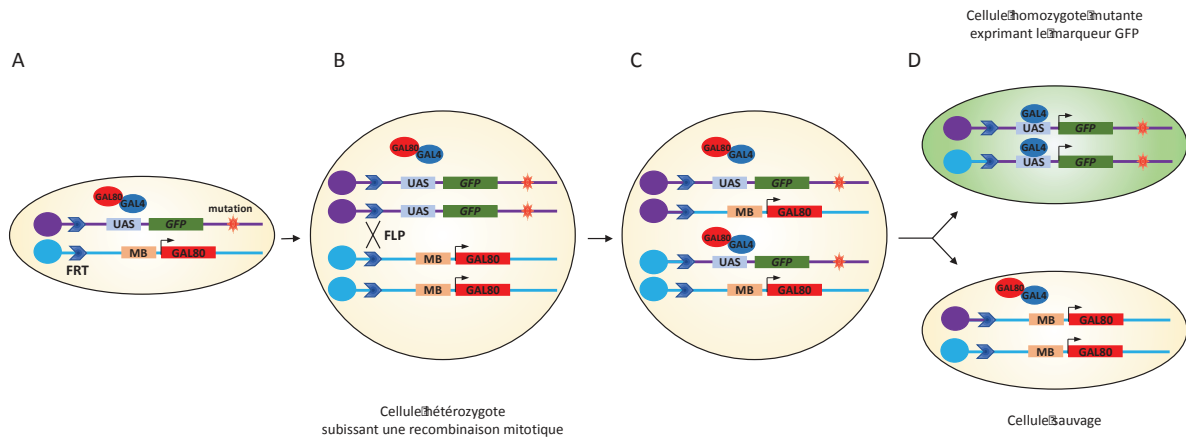
L'ensemble des souches et des croisements a été réalisé et maintenu dans des conditions standards (25°C), sur un milieu à base de levure et d'agar.

Pour l'étude des interactions entre *App1* et les différents gènes candidats, les croisements ont été réalisés, sauf signalés en cas contraire, à partir de femelles vierges provenant de la souche *App1<sup>d w</sup> ; c739-GAL UAS-mitoGFP / CyO<sup>GFP</sup>*, croisées avec soit des mâles contrôles *yw<sup>c</sup> (cs)*, soit avec des mâles portant une mutation du gène à tester.

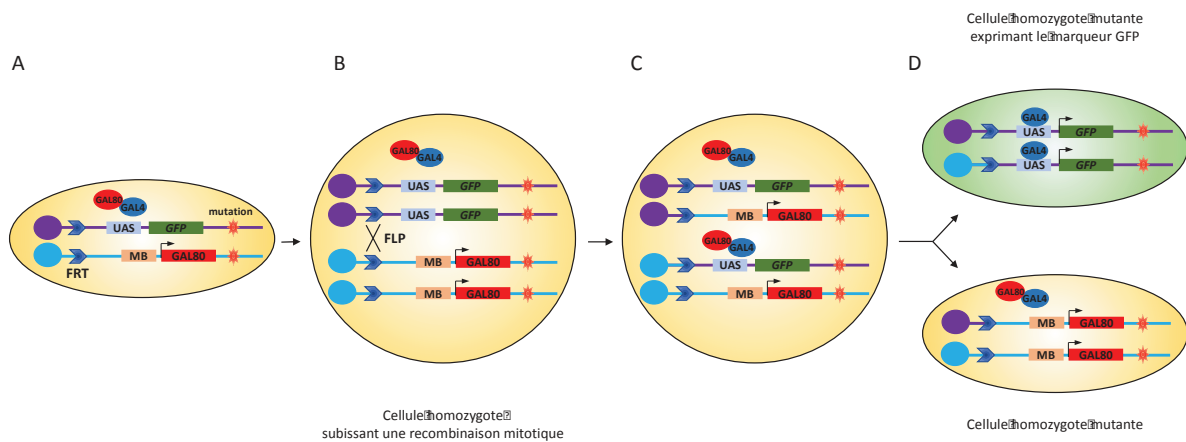
## 2. Système UAS-GAL4

Le système UAS-GAL4, développé par Brand et Perrimon (Brand & Perrimon, 1993), repose sur deux éléments : la séquence d'activation de transcription UAS et le pilote d'expression GAL4. L'expression de la protéine GAL4 se fait sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique. Cette protéine GAL4 reconnaît spécifiquement les séquences UAS, et permet la transcription du gène qui se trouve en aval de ces séquences. Ce système permet donc l'expression d'un gène d'intérêt dans un tissu défini.

L'expression de la protéine GAL4 peut être inhibée par le GAL80. A l'instar du GAL4, cette protéine est aussi exprimée sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique. Ainsi le GAL4 sera inhibé dans le tissu exprimant le GAL80, ce qui induit une absence de transcription du gène d'intérêt dans ce même tissu. (**Figure 113**)



**Figure 114 : Le système MARCM canonique.** (A). Dans cette cellule, le chromosome en violet porte une construction UAS-GFP et une mutation. Le chromosome en bleu porte une construction GAL80. Cette cellule n'exprime pas de GFP. (B). La flipase reconnaît les séquences FRT portées par ces chromosomes, et induit une recombinaison mitotique. (C). Les chromosomes après recombinaison. (D). Les deux cellules filles obtenus après ségrégation des chromosomes. Alors que l'une d'entre elle est sauvage, sans marqueur, l'autre est homozygote mutante, et exprime la GFP suite à la perte de la construction GAL80.



**Figure 115 : Le système MARCM de visualisation.** (A). Dans cette cellule homozygote mutante, le chromosome en violet porte une construction UAS-GFP. Le chromosome en bleu porte une construction GAL80. Cette cellule n'exprime pas de GFP. (B). La flipase reconnaît les séquences FRT portées par ces chromosomes, et induit une recombinaison mitotique. (C). Les chromosomes après recombinaison. (D). Les deux cellules filles obtenus après ségrégation des chromosomes. Les deux cellules sont mutantes homozygotes, l'une d'entre elle est sans marqueur, l'autre exprime la GFP.

### 3. Système MARCM

Le système MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker), décrit par Lee et Luo (Lee & Luo, 1999), permet de générer un clone homozygote mutant dans un contexte hétérozygote pour cette mutation. Les clones sont visualisables grâce à l'expression de la GFP sous le contrôle d'un GAL4. Ce système repose sur une recombinaison mitotique de séquences FRT (Flipase Recognition Target) par une flipase, elle-même sous contrôle d'un promoteur thermosensible. Cela nous permet de contrôler le stade du développement auquel se fera la formation du clone (**Figure 114**). Nous pouvons détourner cette technique afin de réaliser des clones de visualisation. De cette façon, il nous est possible de suivre, grâce à la GFP, un clone homozygote mutant dans un individu, lui aussi, homozygote mutant. (**Figure 115**)

### 4. Dissections

-Cerveaux adultes

Les drosophiles sélectionnées sont endormies au CO<sub>2</sub>, puis anesthésiées à l'éther. Les têtes et thorax sont fixés dans une solution de formaldéhyde 3,7% (dans du PBS 1X) pendant une heure à température ambiante. Après un lavage, les cerveaux sont disséqués dans du PBS 1X. Une fois extraits, les cerveaux sont placés dans une solution de PBS-T (PBS 1X - Triton 0,5X).

-Cerveaux de larve et pupes

Les cerveaux larvaires et pupaux sont disséqués dans du PBS 1X. Ils sont ensuite fixés dans une solution de formaldéhyde 3,7% pendant 30 minutes, puis rincés 3 X 20 minutes dans une solution de PBS-T à 4°C.





Après la dissection, les cerveaux adultes, larvaires et pupaux sont prêts soit à être montés directement entre lame et lamelle, soit à être traités pour un protocole immunohistochimique.

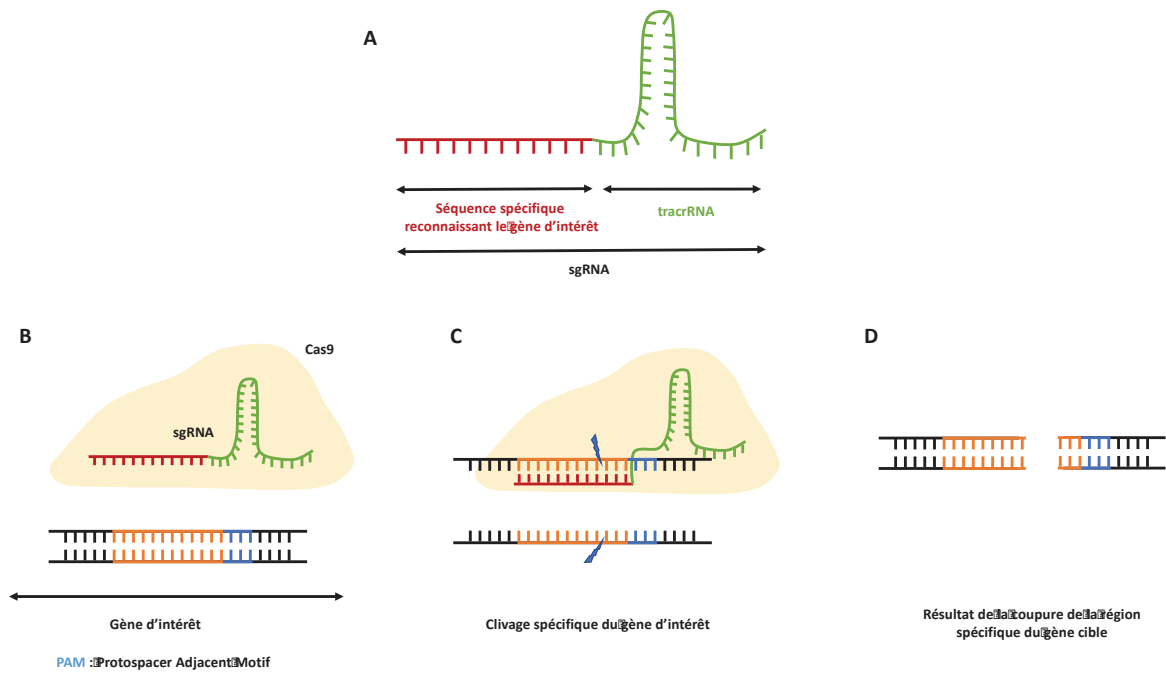
### **5. Analyse des corps pédonculés**

Afin de visualiser les corps pédonculés, plusieurs microscopes ont été utilisés. Pour l'analyse et le comptage des phénotypes, un microscope optique à épifluorescence Leica DM6000B a été utilisé. Pour affiner l'analyse, un microscope confocal ZeissLSM780 a été utilisé. Les photos ont ensuite été traitées par le logiciel ImaJ.

### **6. Immunomarquage**

Après leur dissection, les cerveaux sont incubés pendant 1 heure dans une solution de PBST avec 10% d'albumine de sérum bovin (BSA) à 4°C. Ils sont ensuite incubés avec l'anticorps primaire dans la solution de saturation PBS-T - 10% BSA toute la nuit à 4°C sous agitation.

Après 3 lavages de 30 minutes, les cerveaux sont à nouveau incubés pendant une heure dans une solution de saturation à 4°C. L'anticorps secondaire est ensuite ajouté à cette solution, sous agitation pendant 3 heures, à 4°C et à l'obscurité. Après 3 lavages de 30 minutes dans du une solution de PBS-T, les cerveaux sont prêts à être montés entre lame et lamelle dans une goutte de Vectasheild (Vector Laboratories, USA).



**Figure 115 : La technique du CRISPR-Cas9.** (A). Représentation schématique du sgRNA. Une séquence reconnaissant spécifiquement une région de 20 nucléotides du gène d'intérêt est associée à une séquence tracrRNA. Les deux forment le sgRNA. (B). L'endonuclease Cas9 reconnaît le sgRNA. (C). Formation d'un complexe composé du sgRNA, de l'endonuclease sur la région spécifique du gène d'intérêt. Le motif PAM est un motif de reconnaissance pour la Cas9. La formation de ce complexe entraîne une coupure spécifique au niveau de la séquence cible. (D). Résultats de la cassure double brin. Deux mécanismes de réparation peuvent alors se produire : 1. Jonction des extrémités non homologues, aboutissant à une mutation du gène cible. 2. Recombinaison homologue avec des séquences homologues provenant d'un plasmide injecté, aboutissant à l'insertion d'une séquence choisie.

## 7. CRISPR-Cas9

Nous avons créé un nouvel allèle pour *App1*, dans lequel nous avons excisé l'ensemble de la séquence codante. Afin de générer cet allèle nul, nous avons utilisé la technique du CRISPR-Cas9 (Port *et al.* 2014). Les cassures doubles-brins ont été induites par deux sg-RNA, chacun ciblant des séquences de 20 nucléotides précédées d'une séquence PAM (figure), l'un dans la région 5' du gène et l'autre dans la région 3'. Les sg-RNA ciblant les régions 5' et 3' du gène *App1* ont été clonés dans un plasmide à double expression de sg-RNA, pCFD4 (Port *et al.* 2014), en utilisant les oligonucléotides suivants : *App1*-5'-pCFD4-FORWARD : 5'-TAT ATA GGA AAG ATA TCC GGG TGA ACT TC cct gtg cag caa agt gtt aa GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG-3' et *App1*-3'-pCFD4-REVERSE : 5'-ATT TTA ACT TGC TAT TTC TAG CTC TAA AAC aat atc ggg gct tag tcg cc GAC GTT AAA TTG AAA ATA GGT C-3' (les séquences spécifiques à *App1* sont en minuscule) comme décrit dans <http://www.crisprflydesign.org/wp-content/uploads/2014/06/Cloning-with-pCFD4.pdf>. Le plasmide a été inséré dans le génome (en position 89E sur le chromosome 3), afin que les 2 sg-RNA s'expriment de façon stable. L'excision du gène *App1* a été confirmée par séquençage grâce aux couples d'amorces suivants : *App1*<sup>c1.4</sup>-FOR-5'-GAG CCA GAT ACA CAA GCA CA-3' et *App1*<sup>c1.4</sup>-REV-5'-GGC TTT GTT TAC TTC CTG GC-3' ; *App1*<sup>c2.1</sup>-FOR-5'-TCC TAC TAC GTT CCA CAA TC-3' et *App1*<sup>c2.1</sup>-REV-5'-TAA TGC CCA ACA TAT CCA AC-3'.



## Références Bibliographiques

- Akar, C. A., and Wallace, W. C. (1998). Amyloid precursor protein modulates the interaction of nerve growth factor with p75 receptor and potentiates its activation of trkA phosphorylation. *Brain Res Mol Brain Res*. **56**:125-132.
- Al-Harhi, L. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin and its diverse physiological cell signaling pathways in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders, *J. Neuroimmune Pharmacol*. **7**:725-730.
- Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol*. **128**:919-927.
- Alvarez, A.R., Sandoval, P.C., Leal, N.R., Castro, P.U., Kosik, K.S. (2004). Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species of article. *Neurobiol Dis*. **17**:326-336.
- Arribat, Y., Bonneaud, N., Talmat-Amar, Y., Layalle, S., Parmentier, M.L., Maschat, F. (2013). A huntingtin peptide inhibits polyQ-huntingtin associated defects. *PLoS ONE* **8**:e68775.
- Ashley, J., Packard, M., Ataman, B., Budnik, V. (2005). Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J. Neurosci*. **25**:5943-5955.
- Aso, Y., Grubel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult Drosophila characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet*. **23**:156-172.
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman J.M., Moon, R.T., Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* **12**(16):2610-2622.
- Axelrod, J.D. (2001). Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev*. **15**(10):1182-1187.
- Barilá, D. and Superti-Furga, G. (1998). An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nature Genet*. **18**:280-282.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem*. **271**:1613-1620.
- Bello, B., Izergina, N., Caussinus, E., Reichert, H. (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediated progenitor cells in Drosophila brain development. *Neural Dev* **3**:5.
- Benjamin, J.M., Kwiatkowski, A.V., Yang, C., Korobova, F., Pokutta, S., Svitkina, T., Weis, W.I., Nelson, W.J. (2010). AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **189**:339-352.
- Benn, C.L., Sun, T., Sadri-Vakili, G., McFarland, K.N., DiRocco, D.P., Yohrling, G.J., Clark, T.W., Bouzou, B., Cha, J.H. (2008). Huntingtin modulates transcription, occupies gene

- promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine- dependent manner. *J. Neurosci.* **28**:10720-10733.
- Beyreuther, K., Pollwein, P., Multhaup, G., Mönning, U., König, G., Dyrks, T., Schubert, G. Masters, C. L. (1993). Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **24**:91-102.
- Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P., Wetzell, R. (2006). Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J Mol Biol* **355**(3):524-535.
- Blake, M. R., Holbrook, S. D., Kotwica-Rolinska, J., Chow, E. S., Kretschmar, D., Giebultowicz, J. M. (2015). Manipulations of amyloid precursor protein cleavage disrupt the circadian clock in aging *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* **77**:117-126.
- Blum, A.L., Li, W., Cressy, M., Dubnau, J. (2009). Short- and long-term memory in *Drosophila* require cAMP signaling in distinct neuron types. *Curr Biol.* **19**(16):1341-50.
- Bolkan, B. J., Triphan, T., Kretschmar, D. (2012). b-secretase cleavage of the fly amyloid precursor protein is required for glial survival. *J. Neurosci.* **32**:16181-16192.
- Bourdet, I., Preat, T., Goguel, V. (2015a). The Full-Length Form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein Is Involved in Memory Formation. *J. Neurosci.* **35**(3):1043-1051.
- Bourdet, I., Lampin-Saint-Amaux, A., Preat, T., Goguel V. (2015b). Amyloid- $\beta$  Peptide Exacerbates the Memory Deficit Caused by Amyloid Precursor Protein Loss-of-Function in *Drosophila*. *PLoS ONE* **10**(8):e0135741.
- Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between  $\beta$ -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* **18**: 2225-2230.
- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* **293**:115-120.
- Carmine-Simmen, K., Proctor, T., Tschäpe, J., Poeck, B., Triphan, T., Strauss, R., Kretschmar, D. (2009). Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- $\beta$  peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol. Dis.* **33**:274-281.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., Tartari, M. (2005). Normal huntingin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nature reviews Neuroscience* **6**:919-930.
- Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., Holzbaur, E.L. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:10045-10050.
- Ceron, J., Gonzalez, C., Tejedor, F.J. (2001). Patterns of cell division and expression of asymmetric cell fate determinants in postembryonic neuroblast lineages of *Drosophila*. *Dev Biol.* **230**:125-138.
- Chabaud, M.A., Isabel, G., Kaiser, L., Preat, T. (2009). Social facilitation of long-lasting memory retrieval in *Drosophila*. *Curr Biol.* **19**:1654-1659.
- Choi, H.J., Huber, A.H., Weis, W.I. (2006). Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* **281**: 1027-1038.
- Clabough, E.B. and Zeitlin, S.O. (2006). Deletion of the triplet repeat encoding polyglutamine within the mouse Huntington's disease gene results in subtle behavioral/motor

- phenotypes in vivo and elevated levels of ATP with cellular senescence in vitro. *Hum. Mol. Genet.* **15**(4):607-623.
- Clark, C.E., Nourse, C.C., Cooper, H.M. (2012). The tangled web of non-canonical Wnt signaling in neural migration. *Neurosignals* **20**(3):202-220.
- Clarris, H. J., Key, B., Beyreuther, K., Masters, C. L., Small, D. H. (1995). Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Brain Res Dev.* **88**:87-95.
- Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pages, M., Li, X.J., Saudou, F., Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* **27**(15):2124-2134.
- Coluccia, A.M., Vacca, A., Duñach, M., Mologni, L., Redaelli, S., Bustos, V.H., Benati, D., Pinna, L.A., Gambacorti-Passerini, C. (2007). Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J* **26**:1456-1466.
- Cornett, J. Cao, F., Wang, C.E., Ross, C.A., Bates, G.P, Li, S.H., Li, X.J. (2005). Expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nature Genet.* **37**:198-204.
- Cousins, S. L., Hoey, S. E., Anne Stephenson, F., Perkinson, M. S. (2009). Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery. *J Neurochem.* **111**:1501-1513.
- Cupers, P., Orleans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurons in culture. *J Neurochem.* **78**:1168-1178.
- De Belle, J.S. and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science.* **263**(5147):692-5.
- De Ferrari, G.V. and Moon, R.T. (2006). The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders, *Oncogene* **25**:7545-7553.
- Demars, M. P., Bartholomew, A., Strakova, Z., Lazarov, O. (2011). Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin. *Stem Cell Res Ther.* **2**:36.
- Dietz, K.N., Di Stefano, L., Maher, R.C., Zhu, H., Macdonald, M.E., Gusella, J.F., Walker, J. (2015). The *Drosophila* Huntington's disease gene ortholog *dhht* influences chromatin regulation during development. *Hum Mol Genet* **24**:330-345.
- Dorey, K., Engen, J.R., Kretzschmar, J., Wilm, M., Neubauer, G., Schindler, T., Superti-Furga, G. (2001). Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene* **20**:8075-8084.
- Dragatsis, I., Levine, M.S., Zeitlin, S. (2000). Inactivation of *Hdh* in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* **26**:300-306.
- Drake, J. M. Graham, N.A., Stoyanova, T., Sedghi, A., Goldstein, A.S., Cai, H., Smith, D.A., Zhang, H., Komisopoulou, E., Huang, J., Graeber, T.G., Witte, O.N. (2012). Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **109**:1643-1648.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., Weis, W.I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**: 903-915.



- Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., Krainc, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* **296**:2238-2243.
- Dupont, P., Besson, M.T., Devaux, J. Liévens, J.C. (2012). Reducing canonical wntless/Wnt signaling pathway confers protection against mutant Huntingtin toxicity in drosophila, *Neurobiol. Dis.* **47**:237-247.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., MacDonald, M. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* **26**:407-410.
- Fradkin, L.G., van Schie, M., Wouda, R.R., de Jong, A., Kamphotsy, J.T., Radjkoemar-Bansraj, M., Noordermeer, J.N. (2004). The Drosophila Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. *Dev Biol* **272**(2):362-375
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Ellerby, L.M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **279**:20211-20220.
- Galko, M.J. and Krasnow, M.A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae. *PLoS Biol* **2**:E239.
- Gao, Y., and Pimplikar, S. W. (2001). The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:14979-14984.
- Gao, Y.G., Yan, X.Z., Song, A.X., Chang, Y.G., Gao, X.C., Jiang, N., Zhang, Q., Hu, H.Y. (2006). Structural insights into the specific binding of huntingtin proline-rich region with the SH3 and WW domains. *Structure* **14**(12):1755-1765.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**:127-138.
- Gentleman, S. M., Nash, M. J., Sweeting, C. J., Graham, D. I., Roberts, G. W. (1993). Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett.* **160**:139-144.
- Gertler, F.B., Bennett, R.L., Clark, M.J., Hoffmann, F.M. (1989). Drosophila abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell.* **58**:103-113.
- Gertler, F.B., Hill, K.K., Clark, M.J., Hoffmann, F.M. (1993). Dosage-sensitive modifiers of Drosophila Abl tyrosine kinase function: Prospero, a regulator of axonal outgrowth, and Disabled, a novel tyrosine kinase substrate. *Genes Dev* **7**:441-453.
- Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., Rasper, D.M., Roy, S., Hayden, M.R., Nicholson, D.W. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nature Cell Biol.* **4**:95-105.
- Giniger, E. (1998). A role for Abl in Notch signaling. *Neuron* **20**:667-681.

- Godin, J.D., Poizat, G., Hickey, M.A., Maschat, F., Humbert, S., (2010). Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease, *EMBO J.* **29**:2433-2445.
- Goguel, V., Belair, A.L., Ayaz, D., Lampin-Saint-Amaux, A., Scaplehorn, N., Hassan, B.A., Preat, T. (2011). Drosophila amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *J Neurosci* **31**:1032-1037.
- Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Hayden, M.R. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat. Genet.* **13**:442-449.
- Gombos, R., Migh, E., Antal, O., Mukherjee, A., Jenny, A., Mihály, J. (2015). The Formin DAAM functions as molecular effector of the planar cell polarity pathway during axonal development in Drosophila. *J Neurosci* **35**(28):10154-10167.
- Goodrich, L.V. (2008). The plane facts of PCP in the CNS. *Neuron* **60**:9-16.
- Grevengoed, E.E., Loureiro, J.J., Jesse, T.L., Peifer, M. (2001). Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in Drosophila of article. *J Cell Biol.* **155**:1185-1198.
- Gubb, D., and Garcia-Bellido, A. (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol* **68**:37-57.
- Gunawardena, S., and Goldstein, L. S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila. *Neuron* **32**:389-401.
- Gunawardena, S., Her, L.S., Bruschi, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., Goldstein, L.S. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in Drosophila. *Neuron* **40**(1):25-40.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfry, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., Selkoe, D.J., (1992). Amyloid -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**:322-327.
- Habas, R., Kato, Y., He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**(7):843-854.
- Hantschel, O. and Superti-Furga, G. (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1):33-44.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfer, D. P., Muller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* **20**:7951-7963.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., Byers, D. (1985). Drosophila mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet.* **2**(1):1-30.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* **4**(4):266-275.
- Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**: 1327-1340.
- Hoe, H. S., Fu, Z., Makarova, A., Lee, J. Y., Lu, C., Feng, L., Pajoohesh-Ganji, A., Matsuoka, Y., Hyman, B. T., Ehlers, M. D., Vicini, S., Pak, D. T., Rebeck, G. W. (2009). The effects of

- amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *J Biol Chem.* **284**:8495-8506.
- Hu, Y., Hung, A. C., Cui, H., Dawkins, E., Bolos, M., Foa, L., Young, K. M., Small, D. H. (2013). Role of cystatin C in amyloid precursor protein-induced proliferation of neural stem/progenitor cells. *J Biol Chem.* **288**:18853-18862.
- Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R.R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C.A., Hayden, M.R., El-Husseini, A. (2004). Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. *Neuron* **44**:977–986.
- Huber, A.H. and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/Ecadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* **105**: 391–402.
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., Doms, R.W., (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33729–33737.
- Ignatova, Z. and Gierasch, L.M. (2006). Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(36):13357-61.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D. (1997). The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurons and glial cells. *Development* **124**:761-771.
- Jenny, A., Darken, R.S., Wilson, P.A., Mlodzik, M. (2003). Prickle and Strabismus form a functional complex to generate axis during planar cell polarity signaling. *EMBO J.* **22**(17):4409-4420.
- Jeong, H., Then, F., Melia, T.J., Jr., Mazzulli, J.R., Cui, L., Savas, J.N., Voisine, C., Paganetti, P., Tanese, N., Hart, A.C., Yamamoto, A., Krainc, D. (2009). Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* **137**(1):60-72.
- Jiménez, F., Martin-Morris, L.E., Velasco, L., Chu, H., Sierra, J., Rosen, D.R., White, K. (1995). Vnd, a gene required for early neurogenesis of Drosophila, encodes a homeodomain protein. *EMBO J.* **14**:3487-3495.
- Jing, Z., Caltagarone, J., Bowser, R. (2009). Altered subcellular distribution of c-Abl in Alzheimer's disease of article. *J Alzheimers Dis.* **17**:409-422.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M., Hayden, M.R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* **271**(32):19385-19394.
- Kannan, R., Song, J.K., Karpova, T., Clarke, A., Shivalkar, M., Wang, B., Kotlyanskaya, L., Kuzina, I., Gu, Q., Giniger, E. (2017). The Abl pathway bifurcates to balance Enabled and Rac signaling in axon patterning in Drosophila. *Development.* **144**:487-498.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* **325**:733-736.
- Kawamura, Y., Kikuchi, A., Takada, R., Takada, S., Sudoh, S., Shibamoto, S., Yanagisawa, K., Komano, H., (2001). Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling

- pathway by enhancement of beta-catenin phosphorylation, *Eur. J. Biochem.* **268**:3036-3041.
- Kenyon, F. C. (1896). The brain of the bee. A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the arthropoda. *Journal of Comparative Neurology.* **6**(3):133-210.
- Mohwi, M. and Doe, C.Q. (2013). Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nat Rev Neurosci* **14**(12):823-838.
- Koleske, A.J., Gifford, A.M., Scott, M.L., Nee, M., Bronson, R.T., Miczek, K.A., Baltimore, D. (1998). Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* **21**:1259-1272.
- Kunz, T., Kraft, K.F., Technau, G.M., Urbach, R. (2012). Origin of Drosophila mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *Development* **139**(14):2510-2522.
- Lai, A., Sisodia, S. S., Trowbridge, I. S. (1995). Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* **270**:3565-3573.
- Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R.K., Wellington, C.L., Raymond, L.A., Hayden, M.R. (2006). Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem* **96**(4):1121-1129.
- Lee, K. J., Moussa, C. E., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B. W., Turner, R. S., Pak, D. T., Hoe, H. S. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience.* **169**:344-356.
- Lee, R.C., Clandinin, T.R., Lee, C.H., Chen, P.L., Meinertzhagen, I.A., Zipursky, S.L. (2003). The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the Drosophila visual system. *Nat Neurosci* **6**:557-563.
- Lee, T., Lee, A., Luo, L. (1999). Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126**:4065-4076.
- Leyssen, M., Ayaz, D., Hébert, S. S., Reeve, S., De Strooper, B., Hassan, B. A. (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the Drosophila brain. *EMBO J.* **24**:2944-2955.
- Li, S.H., Gutekunst, C.A., Hersch, S.M., Li, X.J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J. Neurosci.* **18**:1261-1269.
- Li, Y., Liu, T., Peng, Y., Yuan, C., Guo, A. (2004). Specific functions of Drosophila amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and non-neural tissues. *J. Neurobiol.* **61**:343-358.
- Li, Z., Karlovich, C.A., Fish, M.P., Scott, M.P., Myers, R.M. (1999). A putative Drosophila homolog of the Huntington's disease gene. *Hum Mol Genet* **8**(9):1807-1815.
- Liebl, E.C., Forsthoefel, D.J., Franco, L.S., Sample, S.H., Hess, J.E., Cowger, J.A., Chandler, M.P., Shupert, A.M., Seeger, M.A. (2000). Dosage sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding. *Neuron* **26**:107-118.
- Lin, J., Sun, T., Ji, L., Deng, W., Roth, J., Minna, J., Arlinghaus, R. (2007). Oncogenic activation of c-Abl in non-small cell lung cancer cells lacking FUS1 expression: inhibition of c-Abl by the tumor suppressor gene product Fus1. *Oncogene* **26**:6989-6996.

- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837–847.
- Loffler, J. and Huber, G. (1992). Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J Neurochem.* **59**:1316-1324.
- Long, D.M., Blake, M.R., Dutta, S., Holbrook, S.D., Kotwica-Rolinska, J., Kretzschmar, D., Giebultowicz, J.M. (2014). Relationships between the Circadian System and Alzheimer’s Disease-Like Symptoms in *Drosophila*. *PLoS ONE* **9**(8): e106068.
- Loureiro, J. and Peifer, M. (1998). Roles of Armadillo, a *Drosophila* catenin, during central nervous system development. *Curr Biol* **8**:622-632.
- Luo, L. Q., Martin-Morris, L. E., White, K. (1990). Identification, secretion and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J. Neurosci.* **10**:3849-3861.
- Luo, L., Tully, T., White, K. (1992). Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron* **9**:595-605.
- Luo, S., Vacher, C., Davies, J.E., Rubinsztein, D.C. (2005). Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol* **169**(4):647-656.
- Luo, S. and Rubinsztein, D.C. (2009). Huntingtin promotes cell survival by preventing Pak2 cleavage. *J Cell Sci* **122**:875-885.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M., Vassar, R., (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer’s beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* **4**:231–232.
- Magara, F., Muller, U., Li, Z. W., Lipp, H. P., Weissmann, C., Stagljar, M. Wolfer, D. P. (1999). Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice under-expressing the beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:4656-4661.
- Martin-Blanco, E. (1997). Regulation of cell differentiation by the *Drosophila* Jun kinase cascade. *Curr Opin Genet Dev* **7**:666-671.
- Martin-Morris, L. E., and White, K. (1990). The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* **110**:185-195.
- Matusek, T., Djiane, A., Jankovics, F., Brunner, D., Mlodzik, M., Mihály, J. (2006). The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton. *Development* **133**(5):957-966.
- McBride, S.M., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., Baker, G., Siwicki, K.K. (1999). Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron.* **24**(4):967-77.
- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.H., Li, X.J. (2006). Interaction of Huntingtin associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J. Biol. Chem.* **281**:3552-3559.
- McNeill, H. and Woodgett, J.R. (2010). When pathways collide: collaboration and connivance among signaling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(6):404-413.

- Meinertzhagen, I. A. and Hanson, T. E. (1993). "The development of the optic lobe," in *The Development of Drosophila Melanogaster*, ed. M. B. A. A. Martinez-Arias (New York, NY: Cold Spring Harbor Press), 1363-1491.
- Merdes, G., Soba, P., Loewer, A., Bilic, M. V., Beyreuther, K., Paro, R. (2004). Interference of human and Drosophila APP and APP-like proteins with PNS development in Drosophila. *EMBO J.* **23**:4082-4095.
- Mora, N., Almudi, I., Alsina, B., Corominas, M., Serras, F. (2013). b amyloid protein precursor-like (*Appl*) is a Ras1/MAPK-regulated gene required for axonal targeting in Drosophila photoreceptor neurons. *J. Cell Sci.* **126**:53-59.
- Moruno-Manchon, J.F., Uzor, N.E., Blasco-Conesa, M.P., Mannuru, S., Pulturi, N., Furr-Stimming, E.E., Tsvetkov, A.S. (2017). Inhibiting sphingosine kinase 2 mitigates mutant Huntingtin-induced neurodegeneration in neuron models of Huntington disease. *Hum Mol Genet.* **26**:1305-1317.
- Mugat, B., Parmentier, M.L., Bonneaud, N., Chan, H.Y., Maschat, F. (2008). Protective role of engrailed in a Drosophila model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* **17**:3601-3616.
- Müller, U.C. and Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**:a006288.
- Myers, R.H., Leavitt, J., Farrer, L.A., Jagadeesh, J., McFarlane, H., Mastromauro, C.A., Mark, R.J., Gusella, J.F. (1989). Homozygote for Huntington disease. *Am J Hum Genet* **45**(4): 615-618.
- Narindrasorasak, S., Lowery, D.E., Altman, R.A., Gonzalez-DeWhitt, P.A., Greenberg, B.D., Kisilevsky, R. Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. (1992) *Lab Invest.* **67**(5):643-652.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**:811-823.
- Ng, J. (2012). Wnt/PCP proteins regulate stereotyped axon branch extension in Drosophila. *Development* **139**(1):165-177.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature.* **362**:75-79.
- Nunan, J. and Small, D.H., (2000). Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**:6-10.
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., Nishimoto, I. (1995). Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem.* **270**:4205-4208.
- Orsulic, S. and Peifer, M. (1996). An in vivo structure-function study of armadillo, the beat-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. *J Cell Biol.* **134**(5):1283-1300.

- Palidwor, G.A., Shcherbinin, S., Huska, M.R., Rasko, T., Stelzl, U., Arumughan, A., Foulle, R., Porras, P., Sanchez-Pulido, L., Wanker, E.E., Andrade-Navarro, M.A. (2009). Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol* **5**(3):e1000304.
- Parr, C., Mirzaei, N., Christian, M., Sastre, M. (2015). Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway represses the transcription of the  $\beta$ -amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter, *FASEB J.* **29**:623-635.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* **38**:9728-9734.
- Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B., Koo, E. H. (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A $\beta$ 42. *J Biol Chem.* **274**:18851-18856.
- Perisse, E., Yin, Y., Lin, A.C., Lin, S., Huetteroth, W., Waddell, S. (2013). Different Kenyon cell populations drive learned approach and avoidance in *Drosophila*. *Neuron* **79**(5):945-956.
- Perrimon, N., and Mahowald, A.P. (1987). Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev Biol* **119**(2):587-600.
- Pluk, H., Dorey, K., Superti-Furga, G. (2002). Autoinhibition of c-Abl. *Cell* **108**:247-259.
- Pokutta, S. and Weis, W.I. (2000). Structure of the dimerization and  $\beta$ -catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell* **5**:533-543.
- Port, F., Chen, H.M., Lee, T., Bullock, S.L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *PNAS* **111**(29):E2967-2976.
- Purro, S.A., Dickins, E.M., Salinas, P.C. (2012). The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid  $\beta$ -mediated synaptic loss. *J. Neurosci.* **32**:3492-3498.
- Qi, J., Wang, J., Romanyuk, O., Siu, C.H. (2006). Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* **17**:1261–1272.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Da Costa, C., Iwata, O., Galiano, M., Hristova, M., Nateri, A.S., Makwana, M., Riera-Sans, L., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Aguzzi, A., Wagner, E.F., Behrens, A. (2004). The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* **43**:57-67.
- Rama, N., Goldschneider, D., Corset, V., Lambert, J., Pays, L. Mehlen, P. (2012). Amyloid precursor protein regulates netrin-1-mediated commissural axon outgrowth. *J. Biol. Chem.* **287**:30014-30023.
- Ramaker, J. M., Swanson, T. L., Copenhaver, P. F. (2013). Amyloid precursor proteins interact with the heterotrimeric G protein Go in the control of neuronal migration. *J. Neurosci.* **33**:10165-10181.
- Ramaker, J. M., Cargill, R.S., Swanson, T.L., Quirindongo, H., Cassar, M., Kretschmar, D., Copenhaver P.F. (2016). Amyloid precursor proteins are dynamically trafficked and processed during neuronal development. *Front. Mol. Neurosci.* **9**:130.
- Redt-Clouet, C., Trannoy, S., Boulanger, A., Tokmatcheva, E., Savvateeva-Popova, E., Parmentier, M.L., Preat, T., Dura, J.M. (2012). Mushroom body neuronal remodelling is

- necessary for short-term but not for long-term courtship memory in *Drosophila*. *Eur J Neurosci* **35**(11):1684-1691.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* **24**:742-752.
- Reynaud, E., Lahaye, L.L., Boulanger, A., Petrova, I.M., Marquilly, C., Flandre, A., Martianer, T., Privat, M., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G., Dura, J.M. (2015). Guidance of *Drosophila* mushroom body axons depends upon DRL-Wnt receptor cleavage in the brain dorsomedial lineage precursors. *Cell Rep.* **11**(8):1293-1304.
- Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J., Balsamo, J. (2007). Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* **9**:883-892.
- Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* **276**(18): 14545-14548.
- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfner, D. P., Muller, U. C. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* **27**:7817-7826.
- Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q., White, K. (1989). A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2478-2482.
- Rosi, M.C., Luccarini, I., Grossi, C., Fiorentini, A., Spillantini, M.G., Prisco, A., Scali, C., Gianfriddo, M., Caricasole, A., Terstappen, G.C., Casamenti, F. (2010). Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease, *J. Neurochem.* **112** 1539-1551.
- Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., Parker, M. W. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol.* **6**:327-331.
- Salbaum, J. M. and Ruddle, F. H. (1994). Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *J. Exp. Zool.* **269**:116-127.
- Sato, M., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Tabata, T. (2006). DWnt4 regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the *Drosophila melanogaster* visual system. *Nat Neurosci* **9**:67-75.
- Schlatterer, S.D., Tremblay, M.A., Acker, C.M., Davies, P. (2011). Neuronal c-Abl overexpression leads to neuronal loss and neuroinflammation in the mouse forebrain of article. *J Alzheimers Dis.* **25**:119-133.
- Schubert, D., Jin, L.W., Saitoh, T., Cole, G. (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron.* **3**(6):689-694.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C. L. Beyreuther, K. (1991). Localization of Alzheimer beta-A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* **563**:184-194.



- Schwartzberg, P.L., Stall, A.M., Hardin, J.D., Bowditch, K.S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M.L., Robertson, E.J., Goff, S.P. (1991). Mice homozygous for the *abl*<sup>m1</sup> mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* **65**:1165-1175.
- Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C., Bienz, M. (2007). Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* **120**(14):2402-2412.
- Sharp, A.H., Love, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzok, J.A., Steiner, J.P., Lo, A., Hedreen, J., Sisodia, S., Snyder, S.H., Dawson, T.M., Ryugo, D.K., Ross, C.A. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* **14**:1065-74.
- Singh, J., Yanfeng, W.A., Grumolato, L., Aaronson, S.A., Mlodnick, M. (2010). Abelson family kinases regulate Frizzled planar cell polarity signaling via Dsh phosphorylation. *Genes Dev.* **24**:2157-2168.
- Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., Masters, C. L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci.* **14**:2117-2127.
- Smith, J.A. and Liebl, E.C. (2005). Identification of the molecular lesions in alleles of the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase. *Dros. Inf. Serv.* **88**:20-22.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S., Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* **24**:3624-3634.
- Soldano, A., Okray, Z., Janovska, P., Tmejova, K., Reynaud, E., Claeys, A., Yan, J., De Strooper, B., Dura, J.M., Bryja, V., Hassan, B.A. (2013). The *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein is a conserved modulator of Wnt PCP signaling. *PLoS Biol.* **11**:e1001562.
- Sone, M., Uchida, A., Komatsu, A., Suzuki, E., Ibuki, I., Asada, M., Shiwaku, H., Tamura, T., Okazawa, H., Nabeshima, Y. (2009). Loss of yata, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, induces deterioration of neural tissues and lifespan shortening. *PLoS One* **4**:e4466.
- Srinivasan, D. and Plattner, R. (2006). Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**:5648-5655.
- Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6763-6768.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P.P., Thompson, L.M., Marsh, J.L. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**(5667):100-104.
- Stepchenko, A.G., Pankratova, E.V., Doronin, S.A., Gulag, P.V., Georgieva, S.G. (2011). The alternative protein isoform NK2B, encoded by the *vnd/NK-2* proneural gene, directly activates transcription and is expressed following the start of cells differentiation. *Nucleic Acids Research* **39**(13):5401-5411.
- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., Ito, K. (1998). Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem.* **5**(1-2):11-37.

- Takano, H. and Gusella, J.F. (2002). The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- $\kappa$ B/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC Neurosci.* **3**:15.
- Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Nakamura, S., Ueda, K. (1989). Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* **165**(3):1406-1414.
- Tartari, M., Gissi, C., Lo Sardo, V., Zuccato, C., Picardi, E., Pesole, G., Cattaneo, E. (2008). Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol Biol Evol* **25**(2):330-338.
- Thakur, A.K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V.M., Byeon, I.J., Anjum, D.H., Kodali, R., Creamer, T.P., Conway, J.F., Gronenborn, A.M., Wetzel, R. (2009). Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **16**(4): 380-389.
- Thornton, E., Vink, R., Blumbergs, P. C., Van Den Heuvel, C. (2006). Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* **1094**:38-46.
- Tissir, F. and Goffinet, A.M. (2010). Planar cell polarity signaling in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **20**:572-577.
- Torroja, L., Luo, L., White, K. (1996). APPL, the Drosophila member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons. *J Neurosci.* **16**(15):4638-4650.
- Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I., White, K. (1999a). Neuronal overexpression of APPL, the Drosophila homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr. Biol.* **9**:489-492.
- Torroja, L., Packard, M., Gorczyca, M., White, K., Budnik, V. (1999b). The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* **19**(18):7793-7803.
- Tranoy, S., Redt-Clouet, C., Dura, J.M., Preat, T. (2011). Parallel processing of appetitive short- and long-term memories in Drosophila. *Curr Biol.* **21**(19):1647-53.
- Tschäpe, J.A., Hammerschmied, C., Muhlig-Versen, M., Athenstaedt, K., Daum, G., Kretschmar, D. (2002). The neurodegeneration mutant *löchrig* interferes with cholesterol homeostasis and *Appl* processing. *EMBO J.* **21**:6367-6376.
- Tybulewicz, V.L., Crawford, C.E., Jackson, P.K., Bronson, R.T., Mulligan, R.C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* **65**:1153-1163.
- Valenta, T., Gay, M., Steiner, S., Draganova, K., Zemke, M., Hoffmans, R., Cinelli, P., Aguet, M., Sommer, L., Basler, K. (2011). Probing transcription-specific outputs of b-catenin in vivo. *Genes Dev* **25**: 2631–2643.
- Van Etten, R.A., Jackson, P. Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* **58**:669–678.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G.,

- Citron, M., (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**:735–741.
- Venken, K.J., Popodi, E., Holtzman, S.L., Schulze, K.L., Park, S., Carlson, J.W., Hoskins, R.A., Bellen, H.J., Kaufman, T.C. (2010). A molecularly defined duplication set for the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **186**:1111-1125.
- Vleminckx, K., Kemler, R., Hecht, A. (1999). The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **81**:65-74.
- Vogt, K., Schnaitmann, C., Dylla, K.V., Aso, Y., Rubin, G.M., Tanimoto, H. (2014). Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *Elife* **3**:e02395.
- Wada, H. and Okamoto, H. (2009). Roles of planar cell polarity pathway genes for neural migration and differentiation. *Dev Growth Differ* **51**:233–240.
- Wallace, W. C., Akar, C. A., Lyons, W. E. (1997). Amyloid precursor protein potentiates the neurotrophic activity of NGF. *Brain Res Mol Brain Res.* **52**:201-212.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romnao, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., Tanzi, R.E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* **5**:95-100.
- Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein. *Nat. Med.* **3**:328-332.
- Wellington, C. L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Trifiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., Rowland, K.J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, N., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C.A., Nicholson, D.W., Bredesen, D.E., Hayden, M.R. (1998). Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* **273**:9158-9167.
- Wen, S. and Van Etten, R.A. (1997). The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes & Dev.* **11**:2456-2467.
- Wentzell, J. S., Bolkan, B. J., Carmine-Simmen, K., Swanson, T. L., Musashe, D. T., Kretschmar, D. (2012). Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **46**:78-87.
- Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B., Snodgrass, S.R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M.A., Penchaszadeh, G.K., Moreno, H., Gibbons, K., Faryniarz, A., Hobbs, W., Anderson, M.A., Bonilla, E., Conneally, M., Gusella, J.F. (1987). Homozygotes for Huntington's disease. *Nature.* **326**:194-197.
- Weyer, S. W., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost, N., Schaller, K. L., Saar, M., Vogt, M. A., Gass, P., Samanta, A., Jaschke, A., Korte, M.,

- Wolfer, D. P., Caldwell, J. H., Muller, U. C. (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J.* **30**:2266-2280.
- Wills, Z., Bateman, J., Korey, C.A., Comer, A., Van Vactor, D. (1999). The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance. *Neuron* **22**:301-312.
- Woodring, P. J., Hunter, T., Wang, J. Y. (2001). Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin. *J. Biol. Chem.* **276**:27104–27110.
- Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum. Mol. Genet.* **12**:1393–1403.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E.H., Selkoe, D.J. (1997). Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:8208–8213.
- Xue, Y., Lee, S., Wang, Y., Ha, Y. (2011). Crystal structure of the E2 domain of amyloid precursor protein-like protein 1 in complex with sucrose octasulfate. *J Biol Chem.* **286**:29748-29757.
- Zala, D., Hinckelmann, M.V., Saudou, F. (2013). Huntingtin's function in axonal transport is conserved in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **8**:e60162.
- Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* **11**:155-163.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., Wynshaw-Boris, A., Hsieh, J.C., He, X. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**:367-375.
- Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V.M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van deWetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., Yankner, B.A. (1998). Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis, *Nature.* **395**:698-702.
- Zhang, S., Feany, M.B., Saraswati, S., Littleton, J.T., Perrimon, N. (2009). Inactivation of *Drosophila* Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Dis Model Mech* **2**(5-6):247-266.
- Zhang, Y., Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M.E., Hayden, M.R., Friedlander, R.M. (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J* **25**(24):5896-5906.
- Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A.D., Lovett, M., Kosik, K.S. (1997). Presenilin1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family, *Neuroreport.* **8**:2085-2090.

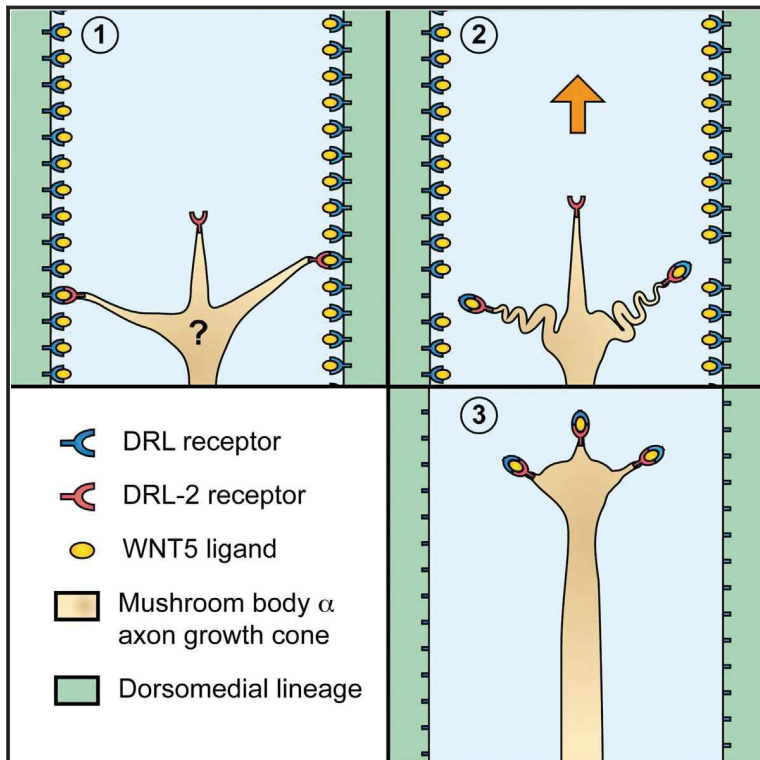


## **Publication annexe**

# Cell Reports

## Guidance of *Drosophila* Mushroom Body Axons Depends upon DRL-Wnt Receptor Cleavage in the Brain Dorsomedial Lineage Precursors

### Graphical Abstract



### Authors

Elodie Reynaud, Liza L. Lahaye, ..., Lee G. Fradkin, Jean-Maurice Dura

### Correspondence

I.g.fradkin@lumc.nl (L.G.F.), jean-maurice.dura@igh.cnrs.fr (J.-M.D.)

### In Brief

Reynaud et al. find that the DRL receptor, which is not expressed in mushroom body axons, guides them during *Drosophila* development by localizing WNT5 ligand on an adjacent brain structure. There, WNT5, in complex with the shed DRL ectodomain, guides axons via repulsion through their intrinsic DRL-2 receptor.

### Highlights

- The DRL receptor positions the WNT5 ligand around the growing mushroom body (MB)
- Localized WNT5 repulses MB axons via their intrinsic DRL-2 receptor
- DRL ectodomain cleavage and shedding is necessary for MB axon guidance
- A DRL ectodomain/WNT5/DRL2 ternary complex is formed



# Guidance of *Drosophila* Mushroom Body Axons Depends upon DRL-Wnt Receptor Cleavage in the Brain Dorsomedial Lineage Precursors

Elodie Reynaud,<sup>1</sup> Liza L. Lahaye,<sup>2</sup> Ana Boulanger,<sup>1</sup> Iveta M. Petrova,<sup>2</sup> Claire Marquilly,<sup>1</sup> Adrien Flandre,<sup>1</sup> Tania Martiane,<sup>2</sup> Martin Privat,<sup>1</sup> Jasprina N. Noordermeer,<sup>2</sup> Lee G. Fradkin,<sup>2,\*</sup> and Jean-Maurice Dura<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Human Genetics, UPR1142, CNRS, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier, France

<sup>2</sup>Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, the Netherlands

\*Correspondence: l.g.fradkin@lumc.nl (L.G.F.), jean-maurice.dura@igh.cnrs.fr (J.-M.D.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.035>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## SUMMARY

**In vivo axon pathfinding mechanisms in the neuron-dense brain remain relatively poorly characterized. We study the *Drosophila* mushroom body (MB) axons, whose  $\alpha$  and  $\beta$  branches connect to different brain areas. We show that the Ryk family WNT5 receptor, DRL (*derailed*), which is expressed in the dorsomedial lineages, brain structure precursors adjacent to the MBs, is required for MB  $\alpha$  branch axon guidance. DRL acts to capture and present WNT5 to MB axons rather than transduce a WNT5 signal. DRL's ectodomain must be cleaved and shed to guide  $\alpha$  axons. DRL-2, another Ryk, is expressed within MB axons and functions as a repulsive WNT5 signaling receptor. Finally, our biochemical data support the existence of a ternary complex composed of the cleaved DRL ectodomain, WNT5, and DRL-2. Thus, the interaction of MB-extrinsic and -intrinsic Ryks via their common ligand acts to guide MB  $\alpha$  axons.**

## INTRODUCTION

The mushroom bodies (MBs) are structures in the insect brain implicated in learning and memory (reviewed in Heisenberg, 2003). Each MB arises from four neuroblasts, which give rise sequentially to three types of neurons:  $\gamma$  neurons (late embryonic and early larval stage),  $\alpha'\beta'$  neurons (late larval stage), and  $\alpha\beta$  neurons (pupal stage). Each  $\alpha\beta$  neuron projects an axon that branches to send an  $\alpha$  branch dorsally, which contributes to the formation of the  $\alpha$  lobe, and a  $\beta$  branch medially, which contributes to the formation of the  $\beta$  lobe (Lee et al., 1999). The  $\alpha$  lobe plays specific roles in long-term aversive memory in the *Drosophila* adult brain (Pascual and Pr  at, 2001; Yu et al., 2006). Different guidance cues are likely required for the  $\alpha$  and  $\beta$  branches. For instance, mutations in the *Eph* and *Hiw* genes result in specific effects on  $\alpha$  branch versus  $\beta$  branch guidance, respectively (Boyle et al., 2006; Shin and DiAntonio, 2011). The

*drl* gene encodes a receptor tyrosine kinase-related protein, which plays roles with its ligand WNT5 in MB development and was first isolated on its role in olfactory memory (Dura et al., 1993; Grillenzoni et al., 2007).

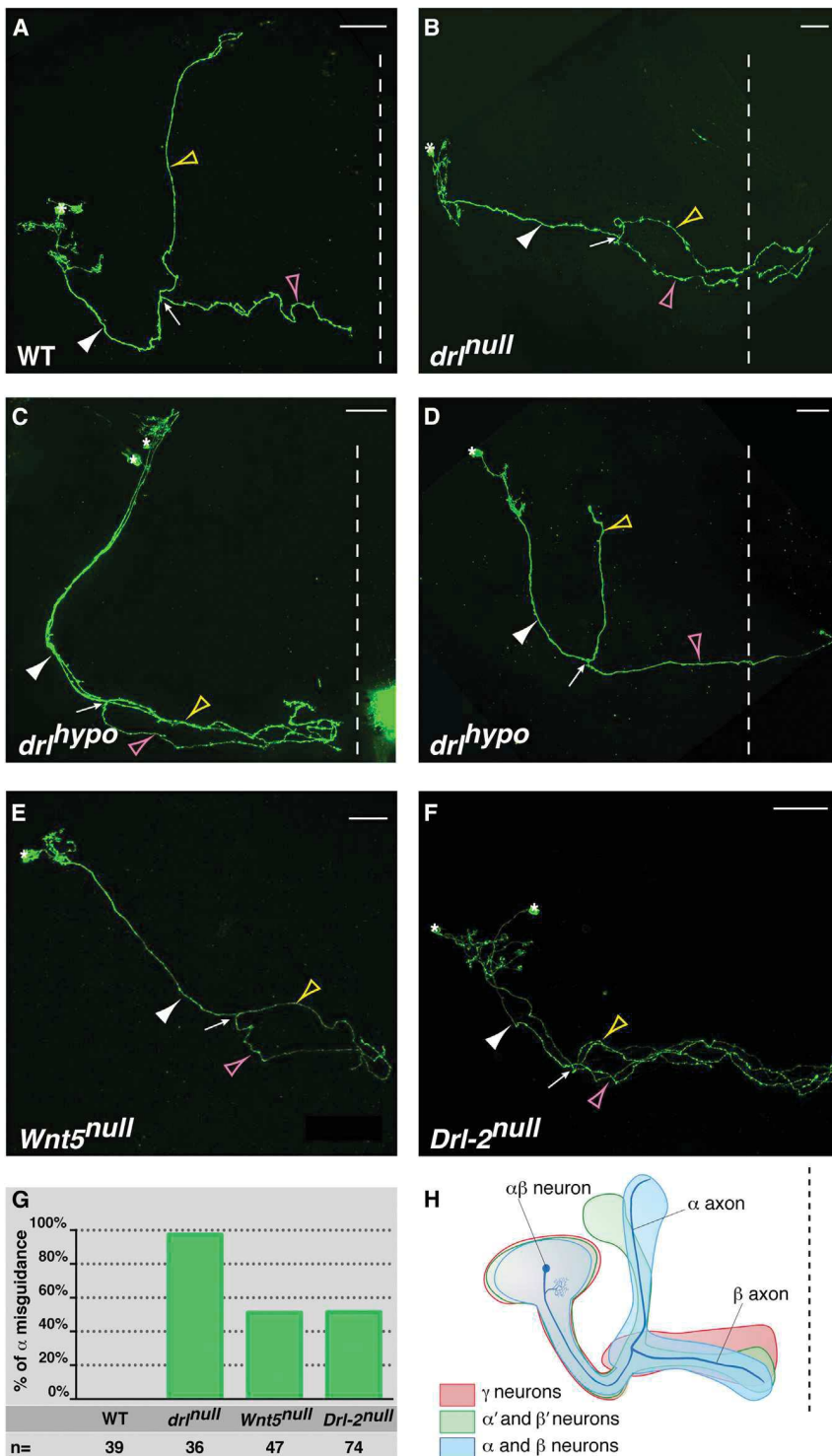
*drl*'s first described role in axon guidance was axon commissure choice in the embryonic nerve cord (Bonkowsky et al., 1999; Callahan et al., 1995; Yoshikawa et al., 2003). Each ventral nerve cord segment has two commissures, one anterior and one posterior, where the axons that project contra-laterally cross the midline. The *drl*<sup>+</sup>-expressing neurons send their axons in the anterior commissure because of the presence of WNT5, a repulsive ligand, in the posterior commissure. Here, we report that *drl* is required during brain development for MB  $\alpha$  branch guidance, but a lack of DRL does not affect branching of the  $\alpha\beta$  axons. We confirm our previous report (Grillenzoni et al., 2007) that *drl* is neither expressed nor required within the  $\alpha\beta$  neurons and demonstrate that, rather, it is expressed by a neural cell lineage adjacent to, but distinct from, the extending MB axons. Interestingly, DRL's cytoplasmic domain, and hence its intracellular signaling activity, is not required for correct  $\alpha$  axon guidance. However, the cytoplasmic domain of another Ryk, DRL-2, which is expressed by MB neurons, is required for  $\alpha$  axon guidance indicating that it acts as an MB axon-intrinsic WNT5 receptor. Furthermore, we demonstrate that DRL's conserved putative tetrabasic cleavage (TBC) site, whose cleavage results in the extracellular shedding of DRL's Wnt-binding domain, is required for MB axon guidance. Finally, we find that the shed DRL extracellular domain forms a complex, via WNT5, with transmembrane DRL-2. Our data indicate a mechanism regulating Wnt signaling where a shed extrinsic receptor serves to guide brain axons.

## RESULTS

### $\alpha$ Axons Are Misguided in *drl* and *Wnt5* Mutants

Here, we show that *drl* is required for appropriate MB  $\alpha$  axon guidance. By examining visualization mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM; Lee and Luo, 1999) MB neuron clones in the *drl*<sup>null</sup> mutant brain, we found that branching of the  $\alpha$  and  $\beta$  branch axons occurs normally but that  $\alpha$  axons extend inappropriately along the medial trajectory and





**Figure 1. DRL, WNT5, and DRL-2 Are Required for MB  $\alpha$  Branch Guidance**

(A) A single  $\alpha\beta$  neuron clone in a wild-type (WT) brain.

(B) A single  $\alpha\beta$  neuron clone in a *drl*<sup>null</sup> brain displaying  $\alpha$  misguidance and inappropriate midline (dotted line) crossing of both the  $\alpha$  (yellow arrowhead) and  $\beta$  (pink arrowhead) axons.

(C and D) Neuron clones in *drl*<sup>hypo</sup> individuals reveal the uncoupling of the  $\alpha$ -misguidance and midline crossing phenotypes.

(E and F) Neuron clones in *Wnt5*<sup>null</sup> (E) and *Drl-2*<sup>null</sup> (F) brains display  $\alpha$  misguidance. In all images, the white arrow indicates the  $\alpha\beta$  branch point and the white arrowhead indicates the peduncle.

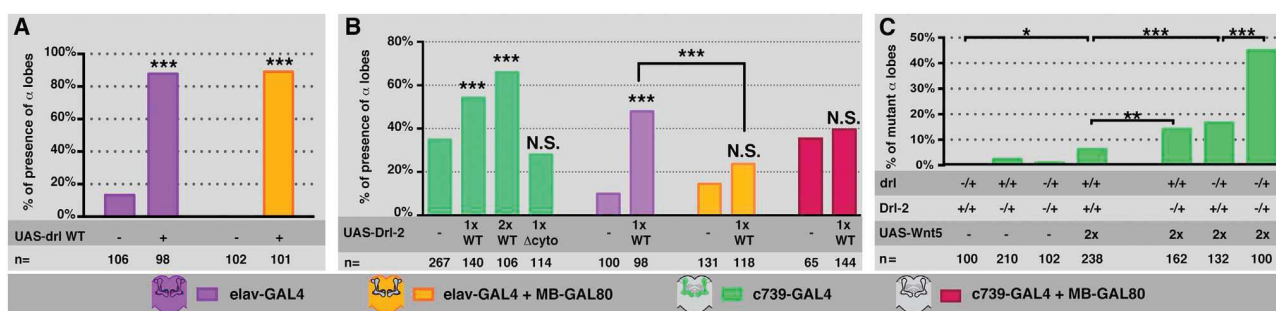
(G) Quantitation of the penetrance of the  $\alpha$  misguidance phenotype in the different mutant and control neuron clones. n = number of clones analyzed. See genotypes and other details in Supplemental Information for Figure 1.

(H) Schematic representation of an  $\alpha\beta$  neuron in the context of the MB lobes.

See also Figures S1 and S2 and Tables S1 and S2.

display aberrant midline crossing (Figures 1A and 1B). Notably, the separation angle between the wild-type (WT)  $\alpha$  and  $\beta$  axon branches is still observed in *drl* mutants (WT:  $118.4^\circ \pm 5.7^\circ$ ; *drl*:  $128.1^\circ \pm 16.6^\circ$ ;  $p = 0.60$ , t test; results are means  $\pm$  SEM with  $n = 5$  in each case), indicating that initial appropriate separa-

tion between the branches occurs. We observed abnormal midline crossing previously in *drl*<sup>null</sup> mutant MBs (Grillen-zoni et al., 2007). These two defects,  $\alpha$  axon misguidance and midline crossing, are independent, since we found one or the other in *drl* hypomorphs (*drl*<sup>hypo</sup>; an incomplete loss-of-function allele) (Figures 1C and 1D; Table S1). In this study, we focus on  $\alpha$  axons, since their trajectory, and not that of the  $\beta$ 's, is altered in the *drl* mutant. We scored for axon growth defects where the axon stops soon after the branching point. Notably, we did not observe  $\alpha$  axon growth defects in the 36 single- and two-neuron-null clones analyzed, but 35 out of these 36 clones (97%) displayed  $\alpha$  misguidance (Figure 1G; Table S2). These results demonstrate that the *drl* receptor is required for MB  $\alpha$  axon guidance.  $\alpha\beta$  axons extend individually and asynchronously from newly born  $\alpha\beta$  neurons, which are derived from continuously dividing neuroblasts for most of the pupal stage (circa 5 days at 25°C).  $\alpha$  axon misguidance was observed in *drl*<sup>null</sup> animals as soon the adult  $\alpha\beta$  axons can be visualized with a specific pioneer  $\alpha\beta$  GAL4 line (*c708a-GAL4*; Zhu et al., 2006) (data not shown). The *c708a-GAL4* was not expressed strongly enough in the early pupae to visualize the pioneer  $\alpha\beta$  at that stage, but the misguidance observed in the adult brain likely reflects earlier guidance errors in the developing brain.



**Figure 2. DRL and DRL-2 Interact with WNT5 and Are Required to Guide  $\alpha$  Branch Axons**

(A) Rescue of the *drl*<sup>null</sup> mutant phenotype by pan-neuronal expression of *UAS-drl* WT driven by *elav-GAL4* (purple) versus expression of *UAS-drl* WT in all non-MB neurons in the *elav-GAL4*; *MB-GAL80* background (orange).

(B) Rescue of the *Drl-2*<sup>null</sup> mutant phenotype by *UAS-Drl-2*, but not by *UAS-Drl-2 $\Delta$ cyto*, driven by the  $\alpha\beta$ -specific *c739-GAL4* driver (green). Rescue of *Drl-2*<sup>null</sup> by *UAS-Drl-2* driven in all neurons by *elav-GAL4* (purple), but not in all non-MB neurons, by *elav-GAL4*; *MB-GAL80* (orange). *c739-GAL4* *MB-GAL80* failed to rescue the *Drl-2*<sup>null</sup> MB phenotype when associated with a *UAS-Drl-2* transgene by inhibiting MB GAL4 expression from *c739-GAL4* (red).

(C) *drl*, *Drl-2* and *Wnt5* genetically interact during  $\alpha$  branch guidance. For all panels, n = number of MBs analyzed and \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05, and N.S. indicates not statistically different by  $\chi^2$  test.

See genotypes and other information in Supplemental Information for Figure 2.

See also Figures S3 and S4.

The WNT5 protein acts as a repulsive axon guidance ligand for the DRL receptor in the embryonic central nervous system (CNS) (Yoshikawa et al., 2003) and is involved in MB development (Grillenzoni et al., 2007). Thus, we evaluated the effects of the loss of *Wnt5* on  $\alpha$  axon guidance in the MBs. The analysis of *Wnt5* mutant brains with *c739-GAL4* line (Figure S1) revealed absence of  $\alpha$  lobe (~30% of the MBs), absence of  $\alpha$  and  $\beta$  lobe (~50% of the MBs), and WT MBs (~20%). If we take into account only where  $\alpha$  axons are affected, examination of visualization MARCM clones in *Wnt5*<sup>null</sup> brains revealed misguidance in 60% of them (n = 20) (Figure 1E) while the remainder had growth defects (Table S2), similar to what was previously reported (Shimizu et al., 2011). Both  $\alpha$  and  $\beta$  guidance were also observed to be affected in the same neurons (Figures S1E and S1H). Altogether, 51% of the *Wnt5*<sup>null</sup> clones (n = 47) displayed  $\alpha$  axon misguidance (Figure 1G; Table S2), indicating that WNT5 is involved in  $\alpha$  axon branch guidance.

DRL is not detectably expressed within the MBs, nor does *UAS-drl* expression driven by MB-specific GAL4 drivers rescue the *drl*<sup>null</sup> phenotype (Grillenzoni et al., 2007). DRL, therefore, is unlikely to be an intrinsic  $\alpha$  branch WNT5 receptor. To further rule out the possibility that DRL expression is required within the MBs, we used the *MB247-GAL80* (*MB-GAL80*; Krashes et al., 2007) transgene to suppress GAL4 activity in the MBs while expressing *drl* in all neurons with *elav-GAL4*. Expression of *MB-GAL80* suppressed the GAL4-driven pan-neuronal expression of a *mCD8-GFP* (*mGFP*) reporter to undetectable levels specifically only in the MBs both at 48 hr APF and in the adult (data not shown), indicating its effectiveness. Pan-neuronal expression of *UAS-drl* in all non-MB neurons rescued the *drl*<sup>null</sup> mutant MB phenotype to the same extent as when *drl* was expressed in all neurons (Figure 2A). Thus, DRL is required outside of, not within, the MB axons to ensure correct  $\alpha$  branch guidance.

### DRL-2 Acts as an MB-Intrinsic Signaling Receptor for $\alpha$ Guidance

What is the intrinsic MB receptor that interacts with the WNT5 ligand to guide  $\alpha$  axons? DRL-2 and DNT (*doughnut*) are the two other *Drosophila* Ryks (Fradkin et al., 2010) and therefore represented plausible candidates. Homozygous *dnt*<sup>null</sup> mutants (Lahaye et al., 2012) did not display any MB phenotype (data not shown). Conversely, *Drl-2*<sup>null</sup> mutant neurons displayed  $\alpha$  axon misguidance (Figure 1F). The analysis of *Drl-2* mutant brains with *c739-GAL4* line (Figure S2) revealed absence of  $\alpha$  lobe (~60% of the MBs) as well as WT MBs (~35%). Altogether, 51% (n = 74) of the *Drl-2*<sup>null</sup> visualization MARCM clones displayed  $\alpha$  misguidance (Figure 1G; Table S2). If we take into account only where  $\alpha$  axons are affected, examination of visualization MARCM clones in *Drl-2*<sup>null</sup> brains revealed that  $\alpha$  misguidance occurred in 90% of them (n = 41) while the other 10% exhibited growth defects (Figure S2; Table S2). Strikingly, *Drl-2* acts non-cell-autonomously in *Drl-2*<sup>-/-</sup> regular MARCM  $\alpha\beta$  MB neuroblast clones in otherwise *Drl-2* heterozygous animals. These clones displayed WT  $\alpha$  guidance (data not shown). Similar non-cell-autonomous Wnt/planar cell polarity-mediated MB axon branch extension defects were previously described for the membrane receptors *frizzled* and *strabismus* (Ng, 2012; Shimizu et al., 2011). Protein perdurance could be an alternative explanation of the absence of mutant phenotype displayed by *Drl-2* regular MARCM clones. Nevertheless, two pieces of data strongly argue against the perdurance of DRL-2. First, the neuroblast clones are induced in L1, days before the birth of the  $\alpha\beta$  neurons. Second, the DRL-2 protein seems to be actively degraded (Figure S3). It is likely that mutant axons surrounded by WT axons correctly pathfind by other mechanisms probably involving axon-axon interactions. Nevertheless, mutant rescue experiments with specific MB GAL4 lines led to the notion of MB autonomy for these membrane receptors (Ng, 2012; Shimizu et al., 2011). Importantly, we were able to rescue *Drl-2*<sup>null</sup>  $\alpha$

misguidance by expressing a *UAS-Drl-2* transgene under the control of the MB  $\alpha\beta$  neuron-specific *c739-GAL4* driver (Aso et al., 2009), but not by expressing *Drl-2* in all non-MB neurons or by inhibiting MB GAL4 expression from *c739-GAL4* by expression of GAL80 in the MBs (Figure 2B). Also, *201Y-GAL4* as well as *c305a-GAL4*, strongly expressed into the  $\gamma$  and  $\alpha'\beta'$  neurons respectively (Aso et al., 2009), failed to rescue the *Drl-2*-null  $\alpha$  misguidance phenotype when associated with a *UAS-Drl-2* transgene (data not shown). These results indicate that *Drl-2* plays an MB-autonomous role in  $\alpha$  branch guidance. This MB axon-specific rescue supports our conclusion that *Drl-2* is an MB axon-intrinsic receptor involved in  $\alpha$  guidance.

Does DRL-2 transduce an intracellular signal in the MB axons? We generated a *UAS-Drl-2 $\Delta$ cyto* transgene, and it failed to rescue the loss of the  $\alpha$  lobe, indicating that DRL-2 likely transduces the WNT5 signal in MB axons (Figure 2B). Supporting our identification of DRL-2 as an MB-intrinsic WNT5 receptor, DRL-2 protein was detected in the growing  $\alpha$  branch at 48 hr after puparium formation (APF) in WT, but not in *Drl-2<sup>null</sup>* mutant brains (Figure S3). No apparent difference in the levels of DRL-2 between the  $\alpha$  and  $\beta$  branches was detected, making it unlikely that DRL-2 localization determines why the  $\beta$  axon trajectories are unaffected in the *Drl-2<sup>null</sup>* mutant background. We then determined whether DRL-2 interacts with WNT5. Epitope-tagged DRL-2 bound WNT5, while DRL-2 lacking its Wnt-binding WIF domain did not, indicating that DRL-2 binds WNT5 via its WIF domain (Figure S4). Therefore, we performed further genetic experiments to determine whether *Wnt5* interacts with *Drl-2* to guide  $\alpha$  axons.

### ***Drl-2*, *Wnt5*, and *drl* Interact Genetically during $\alpha$ Branch Guidance**

Next, we examined whether DRL-2 could act as an axon-repulsing WNT5 receptor in another context. Ectopic expression of WT *drl*, under control of the *eg-GAL4* driver, in *Drosophila* embryonic posterior commissure (PC) axons, which normally do not express DRL, causes them to cross in the adjacent anterior commissure due to their repulsion by WNT5, which is predominantly expressed by PC neurons (Bonkowsky et al., 1999). We found that expression of two copies of *UAS-Drl-2* driven by *eg-GAL4* resulted in >95% axon commissure switching (Figure S4) in the WT background. DRL-2-dependent switching was essentially completely suppressed by the absence of WNT5. Together, these results indicate that DRL-2 can act as a WNT5 axon-repulsing guidance receptor. We conclude that DRL-2 is likely an intrinsic MB receptor, which mediates a repulsive WNT5 signal required for  $\alpha$  axon guidance.

Do *Wnt5*, *Drl-2*, and *drl* genetically interact during  $\alpha$  branch guidance? We were not able to detect genetic interactions, even in the triple-heterozygous condition (*Wnt5<sup>+/-</sup>*; *drl<sup>+/-</sup>* *Drl-2<sup>+/-</sup>* 100% WT MBs, n = 102). Nevertheless, we noticed that when *Wnt5* was strongly overexpressed in the MBs, a modest but significant fraction (<10%) of the MBs showed  $\alpha$  lobe misguidance (Figure 2C). The simplest interpretation for this phenotype could be that an excess of WNT5 emanating from the MBs is binding to DRL-2 receptor but does not provide a guidance cue, because it is not bound and localized by extrinsic DRL (see below). Thus, the amount of available DRL-2 receptor

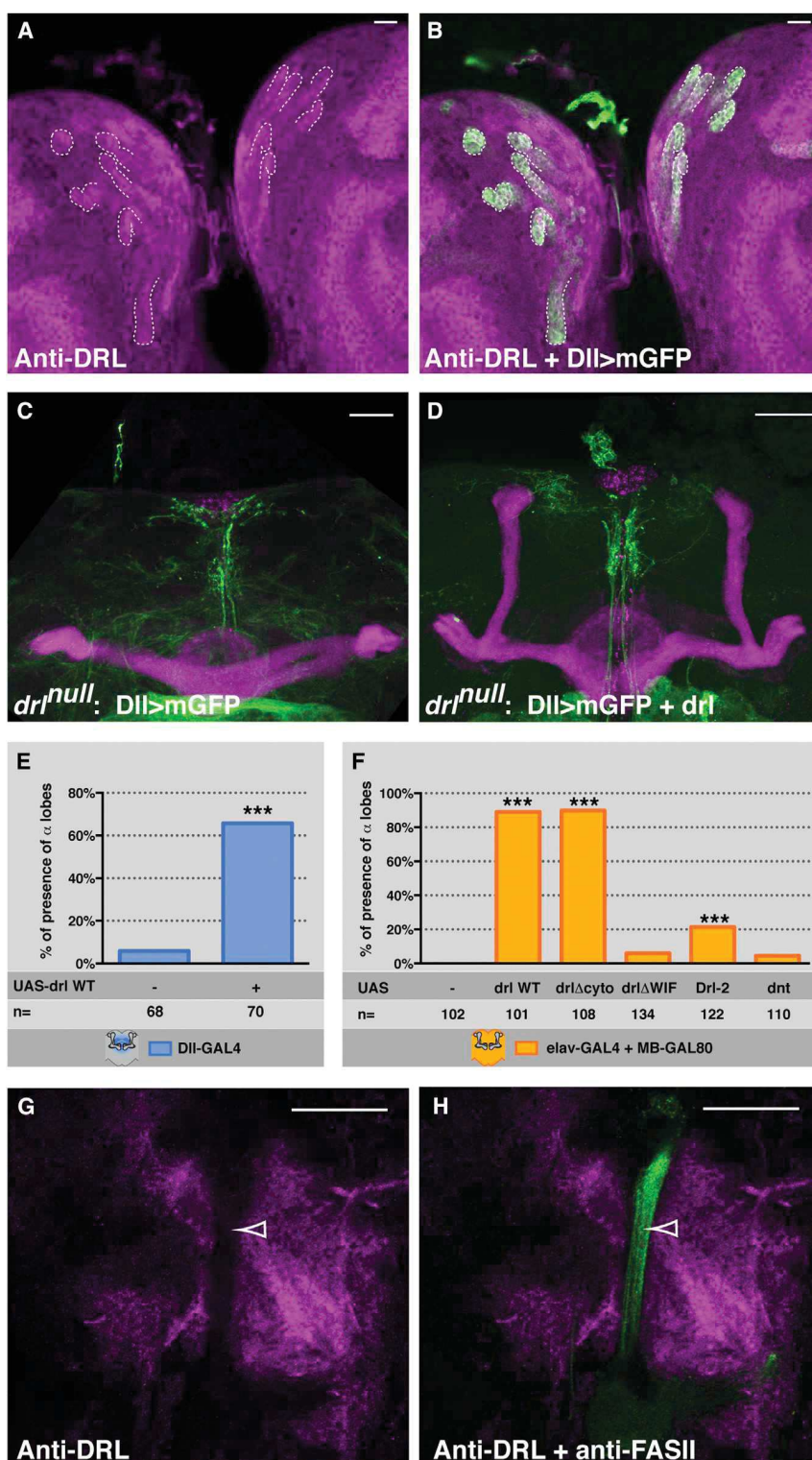
would be decreased. In this situation, reducing the amount of DRL would further increase the amount of free WNT5, and reducing the dose of *Drl-2* will further decrease the amount of available DRL-2. Indeed, when *drl* or *Drl-2* is heterozygous (*drl<sup>+/-</sup>* or *Drl-2<sup>+/-</sup>*) in the WNT5-overexpressing background,  $\alpha$  misguidance significantly increased relative to the controls (Figure 2C). Finally, we observed a dramatic increase in  $\alpha$  misguidance in *drl<sup>+/-</sup>*; *Drl-2<sup>+/-</sup>* brains overexpressing WNT5 (Figure 2C), indicating that *drl*, *Wnt5*, and *Drl-2* interact to guide  $\alpha$  axons.

### **DRL Is Expressed by the Lineages Giving Rise to the Central Complex and Localizes WNT5**

Where is DRL expression required to control  $\alpha$  axon guidance? We tested a number of brain GAL4 drivers, which do not express in the MBs, for their ability to rescue the *drl<sup>null</sup>* phenotype (data not shown). We identified *Distalless (Dll)-GAL4*, which is expressed in the dorsomedial (DM) lineages in the postembryonic brain (Izergina et al., 2009). DM neuroblast lineages contribute to the developing central complex, but not the MB (Bayraktar et al., 2010; Izergina et al., 2009). Indeed, we did not observe *Dll-GAL4* expression in the developing MBs from the third-instar larval to adult stages (data not shown; Figure S5), confirming previous reports. At the third-instar larval stage, DRL is expressed in six large groups of cells at the DM margins of the brain hemispheres (Figure 3A). Upon double labeling brains expressing *mGFP* driven by *Dll-GAL4* with anti-GFP and anti-DRL, we observed colocalization of DRL and GFP in these cells (Figure 3B). Expression of DRL in the DM lineages rescued the *drl<sup>null</sup>* phenotype (Figures 3C–3E). The spatial relationship between the *Dll-GAL4* neurons and the MBs was studied from 0 hr to 48 hr APF and revealed a close proximity of the *Dll-GAL4*-expressing neurons and the developing MBs (Figure S5). Expression of DRL lacking its cytoplasmic domain (*UAS-drl $\Delta$ cyto*), but not DRL lacking its Wnt-binding WIF domain (*UAS-drl $\Delta$ WIF*), in all non-MB neurons rescued the mutant phenotype to the same extent as the *UAS-drl* WT (Figure 3F). Therefore, although DRL must bind WNT5 to act, signaling through DRL is not required for  $\alpha$  branch guidance. DRL's expression in the cells surrounding the MBs at 24 hr APF, but not in them (Figures 3G and 3H), is consistent with an MB-extrinsic role for DRL in  $\alpha$  axon guidance. Does extrinsic DRL act to properly localize WNT5 to guide  $\alpha$  axons? WNT5 is broadly expressed in the developing brain, but a clear WNT5-free channel is present at the level of the  $\alpha$  MB lobes (Shimizu et al., 2011). We found that WNT5 was misexpressed in this region in *drl<sup>null</sup>* brains as early as 24 hr APF (Figure 4). This result indicates that WNT5 distribution in the brain is controlled, at least in part, by the DRL receptor. WNT5 expression appeared globally increased in the *drl* mutant brain. Indeed, *Wnt5* transcript levels, quantitated by qRT-PCR of third-instar brain RNA, were increased 1.5-fold in *drl* mutant brains relative to controls (data not shown). Therefore, in the developing brain, DRL acts to regulate *Wnt5* mRNA levels in addition to its role in localizing the WNT5 protein.

### **Cleavage and Release of DRL's Ectodomain Is Required for $\alpha$ Branch Guidance**

DRL's extracellular domain (ECD) was detected at 48 hr APF on the tips of the MB lobes (Figures 5A–5F). Interestingly, DRL was



**Figure 3. DRL Is Expressed in the Dorsomedial Lineages, Precursors of the Central Complex**

(A) DRL (magenta) is expressed in six large groups of cells at the DM margins of the third-instar brain hemispheres (dotted outlines).

(B) These cells are identified as DM lineage neurons by co-localization of DRL and GFP in brains expressing mGFP (green) driven by *DII-GAL4*.

(C and D) Anti-FASII staining (magenta) reveals the absence of the  $\alpha$  lobes in a *drl*<sup>null</sup> brain (C), which is rescued by expression of *UAS-drl* WT driven by *DII-GAL4* (green; D).

(E) Quantitation of  $\alpha$  lobe rescue by *DII-GAL4* (blue).

(F) Quantitation of rescue of the *drl*<sup>null</sup> phenotype by *drl* WT, *drl*  $\Delta$ cyto, or *Drl-2*, but not by *drl*  $\Delta$ WIF or *dnt*. All constructs are driven by *elav-GAL4*; *MB-GAL80* (orange). n = number of MBs analyzed. \*\*\*p < 0.001 ( $\chi^2$  test).

(G and H) 24-hr-APF WT brains. DRL (magenta) is expressed around, but not in (white arrowhead), the FASII-positive  $\alpha$  branch (green).

See genotypes and details in [Supplemental Information for Figure 3](#).

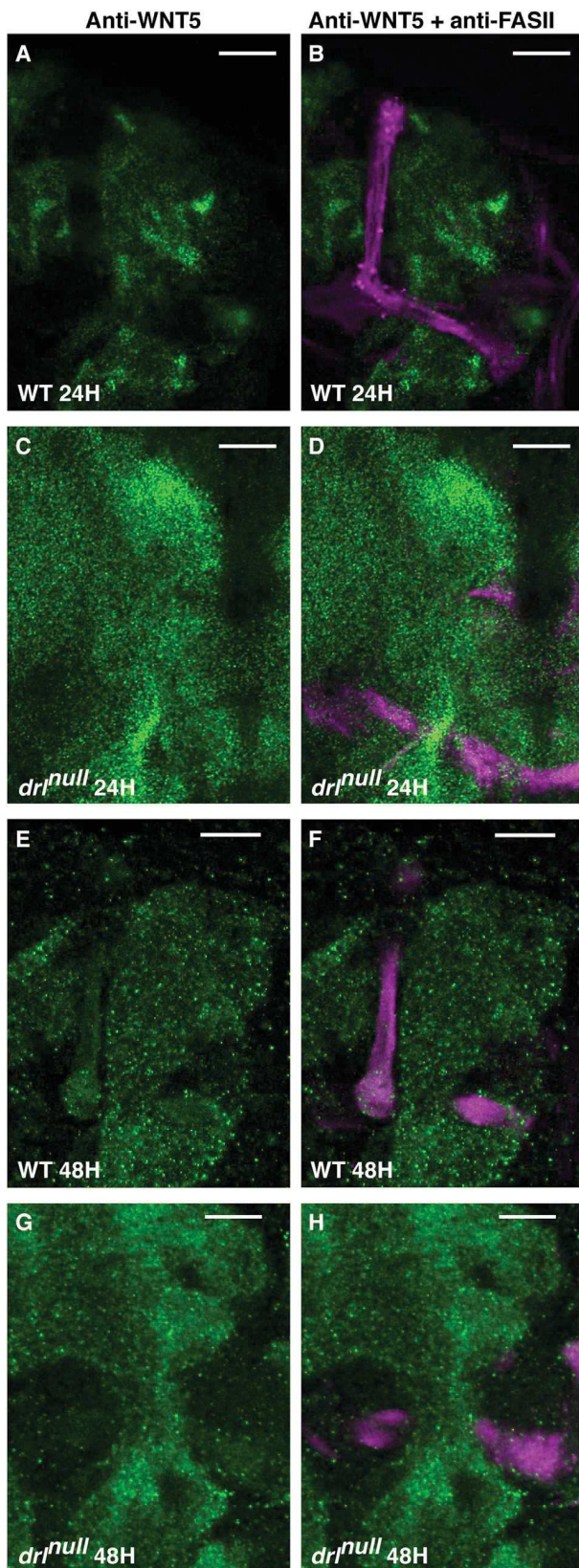
See also [Figure S5](#).

relevant to the *drl* mutant phenotype when only the  $\alpha$  trajectory is affected. Importantly, the intracellular domain of DRL tagged by a C-terminal MYC epitope tag was not found at the tip of the WT  $\alpha$  lobe when a *UAS-drl-WT-MYC* transgene was overexpressed in the DM lineages ([Figure 6](#)), indicating that the cytoplasmic domain of DRL is not localized to the  $\alpha$  lobe tip. Thus we conclude that the DRL species present at the  $\alpha$  lobe tip consists of only the Wnt-binding ECD.

Since *drl* expression is not required in the MBs, yet the DRL ECD was localized to the MB lobe tips, we tested the hypothesis that DRL's ECD is released by proteolysis and shed from expressing cells to guide  $\alpha$  axons. DRL has a putative tetrabasic cleavage (TBC) site whose cleavage would result in the extracellular shedding of DRL's ECD bearing the intact Wnt-binding domain. We mutated the TBC site (KRKK > AAAA) to generate a *UAS-drl $\Delta$ TBC* transgene. Although one copy of WT transgene strongly rescued, even two copies of the *UAS-drl $\Delta$ TBC* transgene failed to rescue the *drl*<sup>null</sup>  $\alpha$  lobe misguidance phenotype (see [Figures 5H](#) and [S6](#) for the sub-cellular spec-

found at significantly higher levels at the  $\alpha$  lobe tip than at the  $\beta$  lobe tip ([Figure 5G](#)). This is the only clear molecular difference between the  $\alpha$  and the  $\beta$  lobes thus far reported and might be

ificity of *UAS-drl $\Delta$ TBC* transgene expression). We also observed that DRL ECD displayed limited diffusion throughout the brain when the TBC site was mutated ([Figure S7](#)), further supporting



**Figure 4. DRL Restricts WNT5 Expression in the Brain**

(A, B, E, and F) Wild-type (WT) 24-hr-APF (A and B) and 48-hr-APF brains (E and F) stained with anti-WNT5 (green) and anti-FASII (magenta) revealed a WNT5-free channel at the level of the  $\alpha$  MB lobes. At 48 hr APF, WNT5 is expressed within the MB lobes, but the channel was still apparent. (C, D, G, and H) *drl*<sup>null</sup> 24-hr-APF (C and D) and 48-hr-APF brains (G and H) where WNT5 was mis-expressed in the channel region. The confocal laser and acquisition and processing settings were the same for the WT and mutant. At 24 hr APF, six MBs were analyzed in both cases (WT and *drl*<sup>null</sup>), with zero mutant and six WT MBs for WT and four mutant and two WT for *drl*<sup>null</sup>. At 48 hr APF, six MBs were analyzed for WT and 12 MBs for *drl*<sup>null</sup>, with 0 mutant and 6 WT MBs for WT and 10 mutant and 2 WT for *drl*<sup>null</sup>. Genotypes: (WT) *w*<sup>1118</sup>/*y w*<sup>67c23</sup> (24 hr APF), *w*<sup>1118</sup> (48 hr APF). (*drl*<sup>null</sup>) *w*<sup>1118</sup>/*w*<sup>1118</sup>; *lio*<sup>2</sup>/*drl*<sup>R343</sup>. Scale bars represent 20  $\mu$ m. Images are single confocal sections.

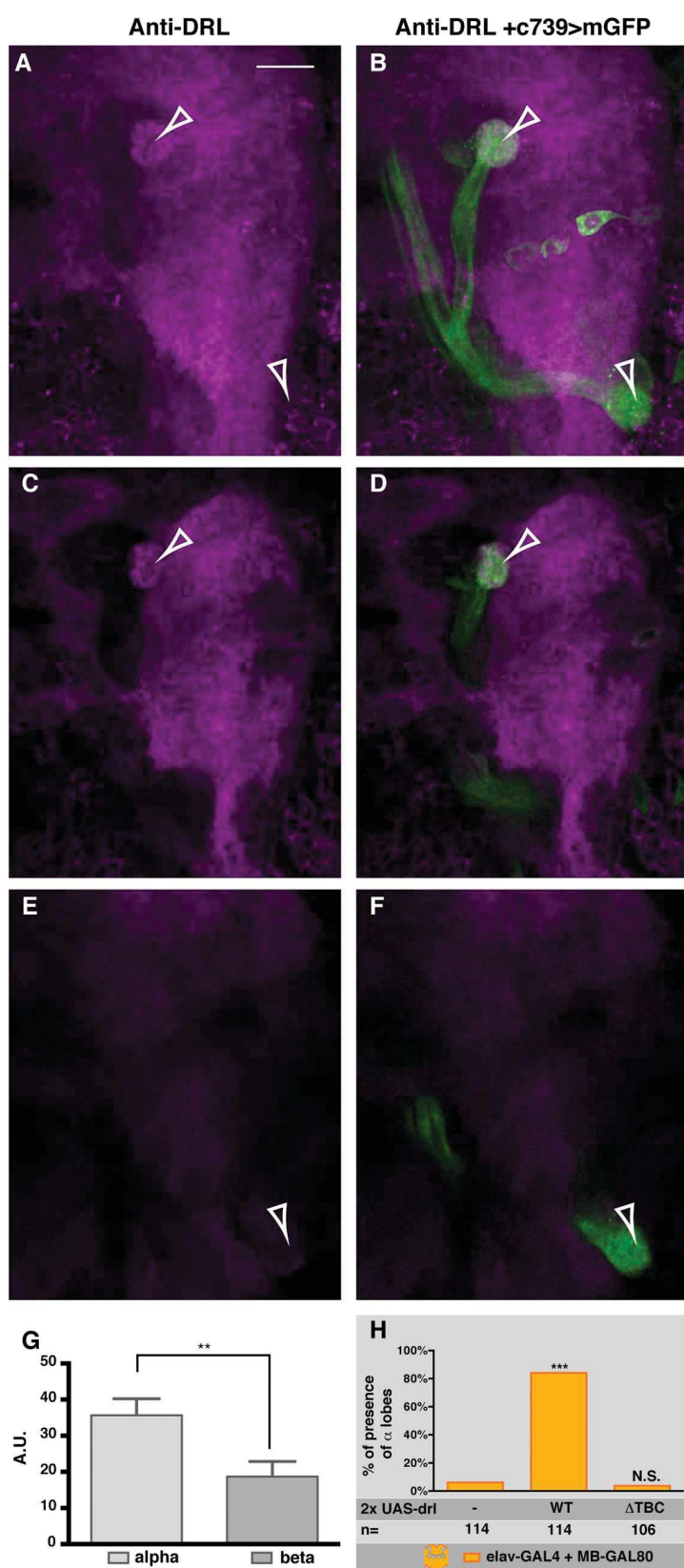
the hypothesis that DRL's ECD is released by cleavage at the TBC site. Finally, anti-MYC immunoblot analyses of third-instar brains expressing either DRL-WT-MYC or DRL- $\Delta$ TBC-MYC revealed the presence of a MYC-tagged species corresponding in size to the expected intracellular cleavage product only from animals expressing wild-type DRL (Figure S7I). This further reinforces the likelihood that DRL is cleaved at the TBC site in vivo.

#### The DRL ECD Forms a WNT5-Dependent Complex with DRL-2

WNT5 is enriched at the tips of the lobes in the 48-hr-APF MBs (Shimizu et al., 2011) (data not shown). The presence of both WNT5 and DRL's ECD at the tips of the 48-hr-APF  $\alpha$  lobes raised the question as to whether the DRL's ECD might form a ternary complex with WNT5 and the MB-intrinsic DRL-2. To investigate this possibility, we transfected Schneider S2 cells with DRL-2 and WNT5 expression constructs. After 48 hr, cells were harvested, washed, and resuspended in serum-free media in the presence of soluble Fc-DRL-ECD, to mimic the DRL ECD species liberated by cleavage at the TBC site, or control human immunoglobulin G (IgG). Fc-containing complexes were captured on protein A agarose, washed, and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting for DRL-2. We found that the Fc-DRL-ECD precipitated DRL-2 only when WNT5 was also expressed (Figure 7). We conclude that DRL's ECD interacts with DRL-2 in a WNT5-dependent manner.

#### DISCUSSION

Here, we have shown that the WT guidance of the MB  $\alpha$  axons results from an interplay between two *Drosophila* Ryks. DRL, expressed outside of but near the MBs, interacts with DRL-2, which is expressed on MB axons, via their common ligand, WNT5. These interactions among DRL, WNT5, and DRL-2 during  $\alpha$  axon guidance contrast with those described for the patterning of the antennal lobes (ALs). DRL in the ALs likely sequesters WNT5 and prevents it from signaling through DRL-2 (Sakurai et al., 2009; Yao et al., 2007). Loss-of-function alleles of all three genes display MB  $\alpha$ -axon misguidance, indicating that these proteins, in contrast to their roles in the ALs, act together, rather than antagonistically, to guide  $\alpha$  axons. Strikingly, while the  $\beta$ -axon trajectories are unaffected in the *drl* and *Drl-2* mutants, these axons often fail to stop at the midline, indicating roles for



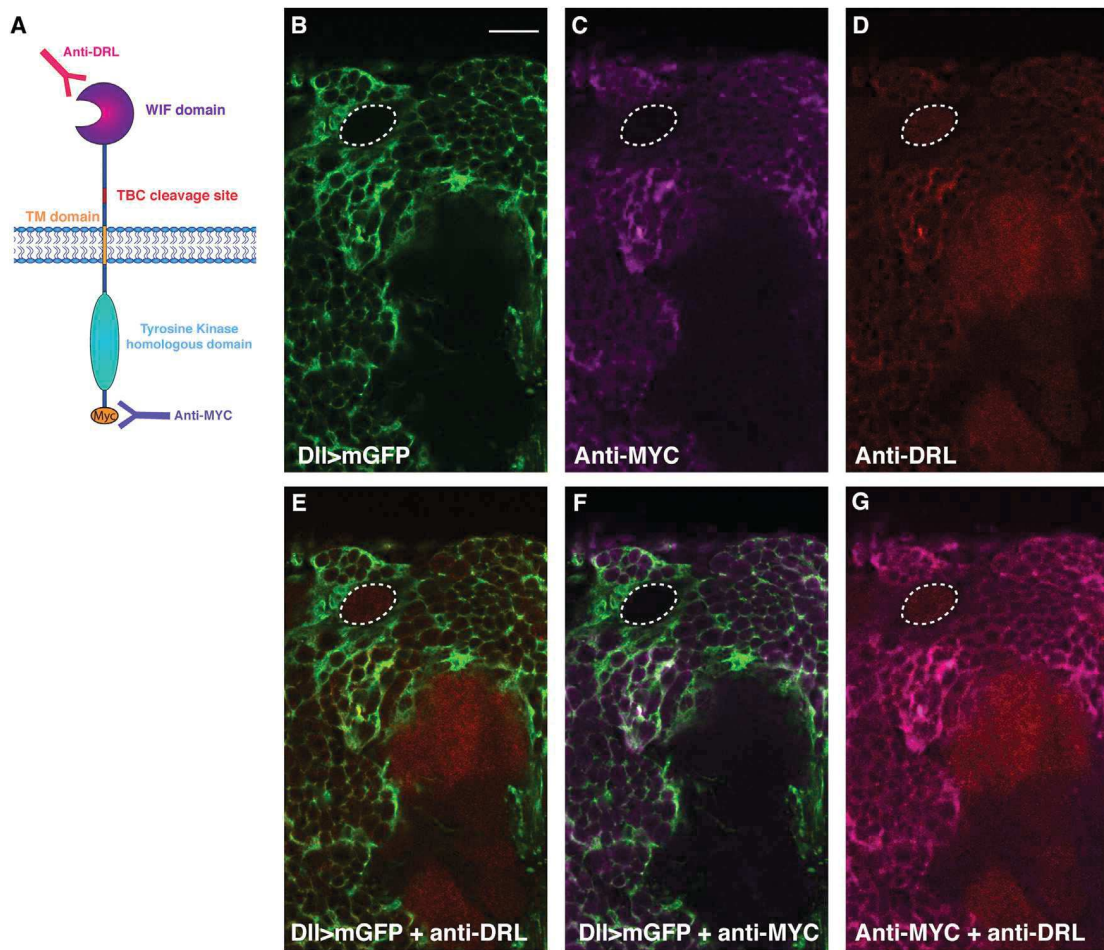
**Figure 5. DRL Is Present at the Tips of the MB Lobes, and DRL's TBC Site Is Required to Rescue the Mutant Phenotype**

(A–F) *c739-GAL4 UAS-mCD8GFP* 48-hr-APF brain. DRL (magenta), detected with an antibody recognizing the ECD, is present at the tip (arrowheads) of the MB lobes (GFP in green). (A and B) 40 confocal sections. (C–F) 1 confocal section.

(G) Quantitation of the intensity of the DRL signal, normalized to that of GFP, in arbitrary units (A.U.). Results are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$  MBs analyzed. DRL was present significantly more at the  $\alpha$  lobe tip than at the  $\beta$  lobe tip. \*\* $p < 0.01$  (paired t test).

(H) DRL's TBC site is required for MB-extrinsic guidance of the  $\alpha$  lobe.  $n =$  number of MBs analyzed. \*\*\* $p < 0.001$ ; NS, not statistically different ( $\chi^2$  test).

See genotypes and details in [Supplemental Information for Figure 5](#).



**Figure 6. The Cleaved DRL ECD Is Present at the Tip of the MB  $\alpha$  Lobe**

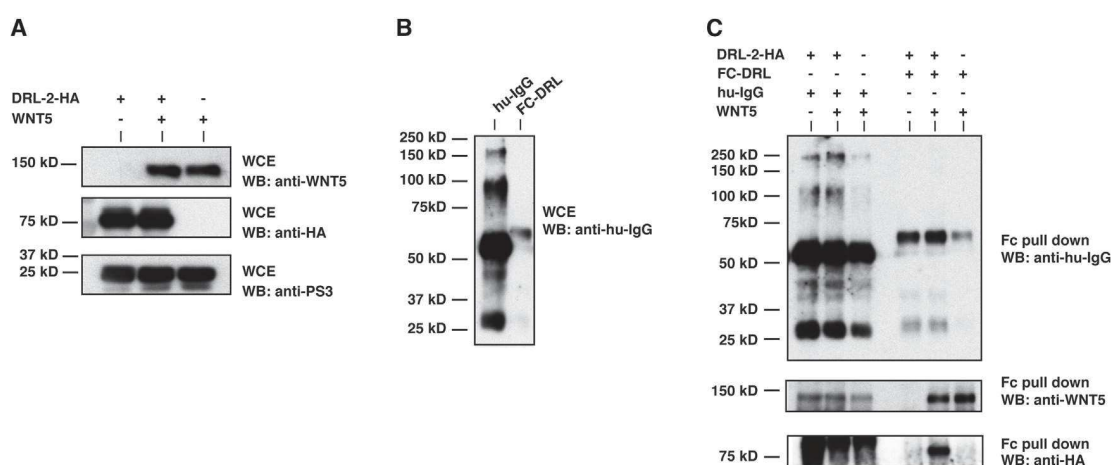
(A) Schematic representation of the DRL ECD and intracellular domain recognized by the anti-DRL and anti-MYC antibody, respectively. (B–G) All images shown are of 48-hr-APF *UAS-mCD8GFP Dll-GAL4* brains. Green represents *Dll-GAL4*-driven GFP, red indicates anti-DRL and magenta anti-MYC. The DRL ECD, revealed by the anti-DRL antibody (red), was found at the tip of the MB  $\alpha$  lobe (dotted circle in D, E, and G). The intracellular domain of DRL tagged by a carboxy-terminal MYC epitope tag (magenta) was not found at the tip of the  $\alpha$  lobe when a *UAS-drl-WT-MYC* transgene was overexpressed under *Dll-GAL4* driver control (dotted circle in C and F). Thus, we conclude that the DRL species present at the  $\alpha$  lobe tip consists of only the Wnt-binding ECD. Genotype: *UAS-drl WT-MYC/y<sup>w<sup>623</sup></sup>*; *UAS-mCD8GFP Dll-GAL4* /+. Scale bars represent 20  $\mu$ m. Images are single confocal sections. See also Figures S6 and S7.

DRL and DRL-2 in the cessation of  $\beta$  axon extension. Further studies will be required to understand the control of  $\beta$  axon extension and to identify the other mechanisms that guide them medially.

We suggest that the DM lineage DRL expression domain in the pupal brain surrounds the growing  $\alpha$  MB lobe where transmembrane DRL captures WNT5 and limits its diffusion. Supporting this is our observation that WNT5 invades this region in the absence of DRL. DRL-bound WNT5 repulses the extending DRL-2-expressing  $\alpha$  axon growth cones, preventing their medial migration, thus causing them to navigate dorsally. Our observation that DRL's TBC site is required for  $\alpha$  axon guidance indicates a likely need for DRL's ECD to be shed to effect  $\alpha$  axon guidance. We cannot visualize the DRL ECD/WNT5 complex on single growing neurons but the presence of DRL ECD and WNT5 at

the tips of the  $\alpha$  branch axons at 48 hr APF of MB development likely reflects the history of the  $\alpha$  axon growth cone interaction with the DRL ECD/WNT5 complex. The continued presence of this complex at the  $\alpha$  lobe tip raises the interesting question as to whether this complex stably modulates DRL-2 signaling. Resolving this question will require the identification of MB signaling pathway members downstream of DRL-2.

The role of axon guidance receptor guiding axons in which it is not expressed is not unprecedented. In *Drosophila*, the *frazzled* (*fra*) receptor guides specific embryonic CNS axons and lamina layer-specific targeting of photoreceptor axons by controlling the distribution of its ligand, Netrin (Hiramoto et al., 2000; Timofeev et al., 2012). The embryonic axons apparently employ an unidentified intrinsic receptor that is not FRA (Hiramoto et al., 2000), while the Netrin receptor expressed by the incoming



**Figure 7. The DRL ECD Forms a WNT5-Dependent Complex with Transmembrane DRL-2**

(A) Immunoblots of whole-cell extracts (WCE).

(B and C) Immunoblots of the Fc immunoprecipitations.

S2 cells were transfected with the indicated expression constructs. 48 hr post-transfection, cells were washed and transferred to serum-free media containing either Fc-DRL ECD or control human IgG. Fc-containing complexes were captured on protein A beads and washed, and proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblot with anti-WNT5 and anti-HA antibodies to detect co-immunoprecipitating WNT5 and DRL-2, respectively. DRL-2 precipitated with the DRL ECD only in the presence of WNT5, indicating that these proteins form a ternary complex. The bands in the human IgG immunoprecipitations on the lower two blots are non-specific, as evidenced by their presence in all three samples. The data shown are representative of three experiments.

photoreceptor is FRA itself (Timofeev et al., 2012). Unlike DRL, FRA at the lamina target site requires its cytoplasmic domain for its own proper localization and function in localizing Netrin (Hiramoto et al., 2000). No evidence that FRA needs to be proteolytically processed for its roles in either tissue has been presented. Strikingly, a recent report of the structure of Netrin complexed with two of its receptors revealed that Netrin has two distinct receptor binding sites (Xu et al., 2014). Wnt protein binding has been shown to oligomerize the Frizzled and LRP co-receptors expressed on the same cell surface, likely by binding to both receptors (Cong et al., 2004). Existing biochemical and structural data, however, do not explicitly address whether monomeric Wnt proteins can simultaneously bind to two receptors, as does Netrin, or whether Wnts act in complexes containing multiple Wnt proteins, such as aggregates, or by being displayed on the surface of exosomes (Beckett et al., 2013; Gross et al., 2012). We described here a ligand-dependent *trans* interaction between two Wnt receptors, DRL and DRL-2, on different cells.

The regulation of axon guidance receptors by proteolytic processing has also been documented for several axon guidance molecules, although in most cases only *in vitro* data are available (reviewed in (Bashaw and Klein, 2010)). Extracellular domains of transmembrane proteins, including cell surface signaling receptors, are often shed by regulated intramembrane proteolysis (reviewed in Brown et al., 2000) to effect extracellular roles or simply as a byproduct of a requirement to release the intracellular domain. In most cases proteolytic processing triggers cytoplasmic signaling pathways. The interaction of membrane-bound Ephrin ligand with the Eph receptor (Hattori et al., 2000) provides an example of the role of a ligand-bound extracellular domain superficially similar to that of WNT5/DRL ECD. Regu-

lated proteolytic cleavage of the membrane-bound ligand enhances growth cone retraction. A more recent study of the role of EphA4 receptor cleavage during spinal motor neuron guidance demonstrated that EphA4 cleavage in the mesenchymal target is required to allow the target-derived ephrinA ligand to interact with EphA4 present on the axon (Gatto et al., 2014). Cleavage-resistant EphA4 sequesters target-derived ephrinA preventing it from repulsing the axon. In contrast, our data support a model where WNT5-binding and cleavage of the DRL ECD is required to facilitate WNT5 signaling through DRL-2. Another clear difference between Eph and DRL mechanisms is that, unlike ephrin, WNT5 is a secreted non-membrane-bound protein. Finally, we have demonstrated that ligand localization and ectodomain shedding are necessary for DRL's role in  $\alpha$  axon guidance.

The DRL ECD may act similarly to the secreted Wnt-binding signaling modulators such as the sFRPs (secreted Frizzled-related proteins) and Dickkopf proteins (reviewed in Cruciat and Niehrs, 2013). However, the difference between WNT5 bound to membrane-anchored DRL versus to a secreted Wnt-modulatory protein is the specificity of their spatial localization. DRL-bound WNT5 could provide a localized repulsive cue to guide axons, while it is unlikely that a widely expressed, freely diffusing, secreted protein could provide a directional signal. Is this axon guidance mechanism conserved? *Drosophila* expresses three Ryks, whereas all other higher eukaryotes express only one. Our finding that *drl* can rescue the *Drl-2* mutant phenotype when expressed in MB neurons (data not shown) indicates that a single Ryk expressed in axons and structures adjacent to them would suffice to guide them. This is further supported by the invariant conservation of the TBC site in all Ryks. Strikingly, DRL's TBC site is also required for its role during embryonic



pathfinding (Petrova et al., 2013) where its cytoplasmic domain, and hence likely signal transduction, is required (Petrova et al., 2013; Yoshikawa et al., 2001). This indicates that cleavage at the juxtamembrane site, likely in addition to an intramembrane cleavage, is possibly necessary for receptor endocytosis or freeing the intracellular domain for transport to the nucleus, the latter having been reported for mammalian Ryk (Lyu et al., 2008).

In both the *Drosophila* embryonic nerve cord and in the developing MBs, localized WNT5 acts as a Ryk guidance cue. WNT5 localization is, however, achieved by two different mechanisms. During embryogenesis, WNT5 is preferentially expressed by posterior commissural neurons, since DRL represses *Wnt5* transcription in anterior commissural neurons (Fradkin et al., 2004). In the MBs, we have shown that WNT5 is localized in a para-MB pattern via the interaction of WNT5 with extrinsic DRL. We also demonstrated that the DRL ECD is shed and forms a ternary complex with WNT5 and the axon-intrinsic DRL-2 receptor. The capture and localization of a widely expressed ligand to the surfaces of cells nearby axons to guide those axons, as well as the formation of a ternary complex by a shed ECD, the ligand, and an axon-intrinsic receptor, may likely prove to be conserved developmental strategies.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Drosophila* Stocks

All crosses were maintained on standard culture medium at 25°C. The following alleles were used: *llo*<sup>2</sup>, *drl*<sup>R343</sup>, *Wnt5*<sup>400</sup>, and *Drl-2*<sup>E124</sup>. Except where otherwise stated, all alleles have been described previously (<http://flystocks.bio.indiana.edu>). To examine the effects of homozygosity for *drl*<sup>null</sup> and for *Drl-2*<sup>null</sup>, we generated *llo*<sup>2</sup>/*drl*<sup>R343</sup> and *Drl-2*<sup>E124</sup>/*Df(2R)Exel8057* animals, respectively, to minimize the effects of the genetic backgrounds of homozygosity for the individual alleles.

### Brain Dissection, MARCM Mosaic Analysis, and Visualization

#### Pupal Brain Dissection and Immunostaining

Brains were dissected and treated as previously described (Timofeev et al., 2012). They were incubated in PBS with 0.5% Triton X-100 (PBT) and 5% normal horse serum (blocking solution) at room temperature for 30 min, followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution. Brains were then washed three times in PBT for 20 min, followed by 30 min in the blocking solution, and then addition of the secondary antibodies with incubation for 2 hr at room temperature. Brains were then washed in PBT for 2 hr and were mounted with Vectashield (Vector Laboratories). Rabbit anti-DRL, guinea pig anti-DRL-2, mouse anti-MYC, and rabbit anti-WNT5 were pre-absorbed with 10  $\mu$ g *w*<sup>67c23</sup> heads and thoraxes in the blocking solution at the final dilution (1:2,000, 1:1,000, 1:1,000, and 1:150, respectively). The pre-absorbed anti-DRL-2 was also pre-absorbed a second time using *Drl-2*<sup>null</sup> mutant 48 hr APF brains. The following secondary antibodies were used at a dilution of 1:500: anti-rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch) and anti-guinea pig Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Anti-Fasciclin II (mAb 1D4 from DSHB) was used at 1:50 dilution followed by anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch) at a dilution of 1:300. For 24 hr and 48 hr APF anti-WNT5 immunostaining, dissected brains were incubated with anti-WNT5 (1:150) in PBS at 4°C for 2 hr 30 min, washed in 1  $\times$  PBS and fixed in PLP for 1 hr at room temperature, then the protocol above was followed.

#### Adult Brain Dissection and Immunostaining

Fly heads and thoraxes were fixed for 1 hr in 3.7% formaldehyde in PBS. Brains were dissected in PBS. They were then treated for immunostaining as previously described (Boulanger et al., 2011; Lee and Luo, 1999). Primary antibody used was anti-Fasciclin II (mAb 1D4 from DSHB) at 1:50 dilution followed by anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch) at 1:300.

### Presence of $\alpha$ Lobes

An  $\alpha$  lobe was considered as present when either an apparently complete WT lobe (>80% of the cases) or thinner lobe (<20% of the cases), with an estimated width  $\geq$  40% of that of WT lobe width, was seen using Fiji software.

### MARCM Clonal Analysis

To generate clones in the MB, we used the MARCM technique (Lee and Luo, 1999). For single- and two-cell clones, 48-hr-APF pupae were heat-shocked at 37°C for 15 min. For neuroblast clones, first-instar larvae were heat-shocked at 37°C for 1 hr. Adult brains were fixed for 15 min in 3.7% formaldehyde in PBS before dissection and staining. We used the term “visualization MARCM clones” when homozygous mutant clones were examined in a homozygous mutant background and “regular MARCM clones” when homozygous mutant clones were examined in a heterozygous background.

### Axon Commissure Switching Assay

The assay was performed essentially as described previously (Callahan et al., 1995), except *UAS-mCD8-GFP* was included to allow visualization of the *eg+* axons by staining with anti-GFP (Roche) and anti-CD8 (Life Sciences).

### qRT-PCR

RNA from third-instar brains was prepared using RNAeasy (QIAGEN) according to the manufacturer's specifications and reversed transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). cDNA was amplified on a CFX384 Real Time PCR System (Bio-Rad) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and intron-spanning primers hybridizing to the *Wnt5* gene and *RP49* control. *Wnt5* RNA levels are reported in arbitrary units normalized to *RP49* levels.

### Microscopy and Image Processing

Images were acquired at room temperature using a Zeiss LSM 780 laser scanning confocal microscope (MRI Platform, Institute of Human Genetics, Montpellier, France) equipped with a 40 $\times$  PLAN apochromatic 1.3 oil-immersion differential interference contrast objective lens. The immersion oil used was Immersol 518F. The acquisition software used was Zen 2011. Contrast and relative intensities of the green (GFP) and magenta (Cy3) channels were processed with Imaris and Fiji software. The angles between  $\alpha$  and  $\beta$  axon branches were measured using the angle tool of Fiji software.

### Constructs, Transgenic Flies, Transfections, Immunoprecipitation, and Immunoblotting

Hemagglutinin (HA)-tagged actin promoter-driven WT *Drl-2* and *Drl-2* lacking its WIF domain ( $\Delta$ WIF) and MYC-tagged UAS WT *drl* and *Drl-2* and their mutants lacking the cytoplasmic or WIF domain expression plasmids were constructed by open reading frame (ORF) PCR, oligonucleotide-mediated mutagenesis and Gateway-mediated recombination (Invitrogen) into appropriate destination vectors (provided by T. Murphey; <http://www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html>). Fc-DRL ECD was constructed by appending DRL ECD-coding sequences in frame to the Fc ORF (kindly provided by John Thomas), and the fusion protein ORF was subsequently transferred into the pDEST10 baculovirus vector. Recombinant Fc-DRL ECD-expressing baculovirus were generated using the Bac-to-Bac system (Invitrogen), and Fc-DRL-ECD protein was purified by protein A chromatography from infected Sf9 cell culture supernatants. All constructs were verified by DNA sequencing. S2 cell transfections were performed using Effectene (-QIAGEN). MYC-tagged *drl*- and *Drl-2* expressing transgenic fly lines (UASs) were generated by BestGene and MYC expression-matched lines (DRL species) and transgenes inserted into the same *attP* site (DRL-2) were subsequently used. Western blot analyses indicate that the *UAS-drl* (WT,  $\Delta$ cyto, and  $\Delta$ WIF) species are similarly expressed when driven by *elav-GAL4* in the third-instar larval brain. Lysates were prepared using a high-stringency buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM sodium chloride, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2 mM sodium orthovanadate 10 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.4 mM EDTA, and 10% glycerol) containing protease inhibitors (Roche). For the immunoblot presented in Figure S7, lysates were prepared from 10 L3 brains homogenized in 1  $\times$  NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) containing 0.5 M DTT. Immunoprecipitations were

performed using rabbit anti-HA (Abcam) and mouse anti-human Fc (Jackson ImmunoResearch). Immunoblots, prepared by standard procedures, were incubated with mouse anti-HA (Sigma), rabbit anti-WNT5 (Fradkin et al., 2004), and mouse anti-MYC (DSHB). Anti-*Drosophila* ribosomal protein P3 (Kelley et al., 2000), kindly provided by M. Kelley and anti-mouse  $\alpha$ -tubulin (Sigma) were used to control for equivalent gel loading. Bound multiple-label grade HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were detected with enhanced ECL reagent (GE Healthcare).

### Statistics

Comparison between groups expressing a qualitative variable was analyzed for statistical significance using the  $\chi^2$  test. Comparison of two groups expressing a quantitative variable was analyzed using the two-tailed Student's *t* test. Comparison of the distribution of the ratios was analyzed using the Wilcoxon rank sum test. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant.

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes additional information about Figures 1, 2, 3, and 5, seven figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.035>.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Florence Besse, Alain Chédotal, and Claude Desplan for thoughtful discussions and support, B. Bello for informing us that *drl* is expressed in the DM lineages and for the *Dll-GAL4* line, C. Hama for the *UAS-Drl2* line and the anti-DRL-2 antibody, H. Korswagen and H. Hing for comments on the manuscript, the Bloomington *Drosophila* Stock Center for fly stocks, and the MRI platform for confocal imaging help. Work in the laboratory of J.-M.D. was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche sur le Cancer (grants 3744 and SFI20121205950) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-NEURO-034-01). E.R. was supported by a PhD grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Association pour la Recherche sur le Cancer. Work in the laboratory of J.N.N. and L.G.F., with excellent technical help from Anja de Jong, was funded by the "Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek" (ZonMw TOP grant 40-00812-98-10058) and the Hersenstichting Nederland (HS 2013[1]-161).

Received: October 27, 2014

Revised: March 7, 2015

Accepted: April 15, 2015

Published: May 14, 2015

### REFERENCES

- Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., and Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J. Neurogenet.* *23*, 156–172.
- Bashaw, G.J., and Klein, R. (2010). Signaling from axon guidance receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001941.
- Bayraktar, O.A., Boone, J.Q., Drummond, M.L., and Doe, C.Q. (2010). *Drosophila* type II neuroblast lineages keep Prospero levels low to generate large clones that contribute to the adult brain central complex. *Neural Dev.* *5*, 26.
- Beckett, K., Monier, S., Palmer, L., Alexandre, C., Green, H., Bonnell, E., Raposo, G., Thibault, P., Le Borgne, R., and Vincent, J.P. (2013). *Drosophila* S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes. *Traffic* *14*, 82–96.
- Bonkowsky, J.L., Yoshikawa, S., O'Keefe, D.D., Scully, A.L., and Thomas, J.B. (1999). Axon routing across the midline controlled by the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* *402*, 540–544.
- Boulanger, A., Clouet-Redt, C., Farge, M., Flandre, A., Guignard, T., Fernando, C., Juge, F., and Dura, J.M. (2011). *ftz-f1* and *Hr39* opposing roles on EcR expression during *Drosophila* mushroom body neuron remodeling. *Nat. Neurosci.* *14*, 37–44.
- Boyle, M., Nighorn, A., and Thomas, J.B. (2006). *Drosophila* Eph receptor guides specific axon branches of mushroom body neurons. *Development* *133*, 1845–1854.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* *100*, 391–398.
- Callahan, C.A., Muralidhar, M.G., Lundgren, S.E., Scully, A.L., and Thomas, J.B. (1995). Control of neuronal pathway selection by a *Drosophila* receptor protein-tyrosine kinase family member. *Nature* *376*, 171–174.
- Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* *131*, 5103–5115.
- Cruciat, C.M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a015081.
- Dura, J.M., Preat, T., and Tully, T. (1993). Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* *9*, 1–14.
- Fradkin, L.G., van Schie, M., Wouda, R.R., de Jong, A., Kamphorst, J.T., Radjkoemar-Bansraj, M., and Noordermeer, J.N. (2004). The *Drosophila* Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. *Dev. Biol.* *272*, 362–375.
- Fradkin, L.G., Dura, J.M., and Noordermeer, J.N. (2010). Ryks: new partners in the developing and regenerating nervous system. *Trends Neurosci.* *33*, 84–92.
- Gatto, G., Morales, D., Kania, A., and Klein, R. (2014). EphA4 receptor shedding regulates spinal motor axon guidance. *Curr. Biol.* *24*, 2355–2365.
- Grillenzoni, N., Flandre, A., Lasbleiz, C., and Dura, J.M. (2007). Respective roles of the DRL receptor and its ligand WNT5 in *Drosophila* mushroom body development. *Development* *134*, 3089–3097.
- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1036–1045.
- Hattori, M., Osterfield, M., and Flanagan, J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* *289*, 1360–1365.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 266–275.
- Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E., and Hotta, Y. (2000). The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* *406*, 886–889.
- Izergina, N., Balmer, J., Bello, B., and Reichert, H. (2009). Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev.* *4*, 44.
- Kelley, M.R., Xu, Y., Wilson, D.M., 3rd, and Deutsch, W.A. (2000). Genomic structure and characterization of the *Drosophila* S3 ribosomal/DNA repair gene and mutant alleles. *DNA Cell Biol.* *19*, 149–156.
- Krashes, M.J., Keene, A.C., Leung, B., Armstrong, J.D., and Waddell, S. (2007). Sequential use of mushroom body neuron subsets during *Drosophila* odor memory processing. *Neuron* *53*, 103–115.
- Lahaye, L.L., Wouda, R.R., de Jong, A.W., Fradkin, L.G., and Noordermeer, J.N. (2012). WNT5 interacts with the Ryk receptors doughnut and derailed to mediate muscle attachment site selection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* *7*, e32297.
- Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* *22*, 451–461.
- Lee, T., Lee, A., and Luo, L. (1999). Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* *126*, 4065–4076.
- Lyu, J., Yamamoto, V., and Lu, W. (2008). Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev. Cell* *15*, 773–780.

- Ng, J. (2012). Wnt/PCP proteins regulate stereotyped axon branch extension in *Drosophila*. *Development* 139, 165–177.
- Pascual, A., and Pr eat, T. (2001). Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294, 1115–1117.
- Petrova, I.M., Lahaye, L.L., Mart a nez, T., de Jong, A.W., Malessy, M.J., Verhaagen, J., Noordermeer, J.N., and Fradkin, L.G. (2013). Homodimerization of the Wnt receptor DERAILED recruits the Src family kinase SRC64B. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4116–4127.
- Sakurai, M., Aoki, T., Yoshikawa, S., Santschi, L.A., Saito, H., Endo, K., Ishikawa, K., Kimura, K., Ito, K., Thomas, J.B., and Hama, C. (2009). Differentially expressed Drl and Drl-2 play opposing roles in Wnt5 signaling during *Drosophila* olfactory system development. *J. Neurosci.* 29, 4972–4980.
- Shimizu, K., Sato, M., and Tabata, T. (2011). The Wnt5/planar cell polarity pathway regulates axonal development of the *Drosophila* mushroom body neuron. *J. Neurosci.* 31, 4944–4954.
- Shin, J.E., and DiAntonio, A. (2011). Highwire regulates guidance of sister axons in the *Drosophila* mushroom body. *J. Neurosci.* 31, 17689–17700.
- Timofeev, K., Joly, W., Hadjieconomou, D., and Salecker, I. (2012). Localized netrins act as positional cues to control layer-specific targeting of photoreceptor axons in *Drosophila*. *Neuron* 75, 80–93.
- Xu, K., Wu, Z., Renier, N., Antipenko, A., Tzvetkova-Robev, D., Xu, Y., Minchenko, M., Nardi-Dei, V., Rajashankar, K.R., Himanen, J., et al. (2014). Neural migration. Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. *Science* 344, 1275–1279.
- Yao, Y., Wu, Y., Yin, C., Ozawa, R., Aigaki, T., Wouda, R.R., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G., and Hing, H. (2007). Antagonistic roles of Wnt5 and the Drl receptor in patterning the *Drosophila* antennal lobe. *Nat. Neurosci.* 10, 1423–1432.
- Yoshikawa, S., Bonkowsky, J.L., Kokel, M., Shyn, S., and Thomas, J.B. (2001). The derailed guidance receptor does not require kinase activity in vivo. *J. Neurosci.* 21, RC119.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R.D., Kokel, M., and Thomas, J.B. (2003). Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* 422, 583–588.
- Yu, D., Akalal, D.B., and Davis, R.L. (2006). *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* 52, 845–855.
- Zhu, S., Lin, S., Kao, C.F., Awasaki, T., Chiang, A.S., and Lee, T. (2006). Gradients of the *Drosophila* Chinmo BTB-zinc finger protein govern neuronal temporal identity. *Cell* 127, 409–422.