



HAL
open science

Caractérisation des précurseurs de muscles adultes et de leurs interactions au cours de l'embryogenèse chez *Drosophila melanogaster*

Guillaume Lavergne

► **To cite this version:**

Guillaume Lavergne. Caractérisation des précurseurs de muscles adultes et de leurs interactions au cours de l'embryogenèse chez *Drosophila melanogaster*. Génétique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC105 . tel-03021369

HAL Id: tel-03021369

<https://theses.hal.science/tel-03021369>

Submitted on 24 Nov 2020

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.

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

Thèse

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Génétique et développement

Soutenue publiquement le vendredi 7 Décembre 2018

LAVERGNE Guillaume

**Caractérisation des précurseurs de muscles adultes et de leurs
interactions au cours de l'embryogenèse chez *Drosophila melanogaster*.**

Membres du JURY

Rapportrice	Dr BESSE Florence
Rapportrice	Dr CROZATIER Michèle
Rapporteur	Dr VINCENT Stéphane
Examinatrice	Dr BRASSET Emilie
Examineur	Dr ENRIQUEZ Jonathan
Directeur de thèse	Dr JAGLA Krzysztof

Laboratoire GReD (Génétique, Reproduction et Développement)
CNRS (UMR6293)- INSERM (U1103)
Université Clermont Auvergne

Résumé

Les précurseurs de muscles adultes (ou AMPs) représentent une population transitoire de cellules souches musculaires chez la *Drosophile*. Ces cellules dérivent du mésoderme embryonnaire et sont caractérisées par l'activation de la voie Notch ainsi que par le maintien d'une forte expression du facteur de transcription Twist (de type basic helix loop helix). La répartition des AMPs chez la larve est établie au cours de l'embryogénèse de manière stéréotypée : on distingue 6 AMPs par hémisegment abdominal en position ventrale, latérale, dorso-latérale et dorsale. Après spécification et jusqu'au début du deuxième stade larvaire, les AMPs sont maintenues dans un état de quiescence, au cours duquel, les AMPs sont en contact étroit avec les fibres musculaires et les axones moteurs.

L'objectif principal de mon projet de thèse a été de caractériser le rôle et le comportement de ces cellules AMPs au cours de l'embryogénèse. Dans un premier temps, j'ai pu montrer que les AMPs sont capables d'attirer les axones moteurs responsables de l'innervation des muscles. Cette attraction passe par l'établissement de contacts entre ces deux tissus via une forte dynamique filopodiale. De plus, une sous-population d'AMPs dans la région latérale est responsable de la formation d'une des branches nerveuses qui innervera le muscle de bordure de segment. La deuxième partie de ce projet s'est concentrée sur l'étude du comportement de ces cellules, ainsi que sur l'analyse du rôle des gènes exprimés dans les AMPs. J'ai ainsi pu mettre en évidence de nouvelles interactions entre les AMPs latérales et leur environnement musculaire. De plus, j'ai identifié de nouveaux marqueurs des AMPs tels que le récepteur Unc-5, la métalloprotéase MMP1 et la protéine de guidance Sidestep.

L'une des contributions majeures de ce projet a été de pouvoir établir pour la première fois le rôle des cellules souches musculaires AMPs dans la mise en place du système nerveux moteur. L'ajout de ce nouvel acteur va permettre une meilleure compréhension des mécanismes de guidance des axones au cours de l'innervation musculaire.

Table des matières

Introduction	1
I. Le modèle drosophile :	1
II. Aperçu de la myogenèse chez la drosophile :	4
III. Mise en place des muscles somatiques :	7
1. Embryogenèse chez la drosophile :	7
2. Mise en place du mésoderme :	7
3. Division antéro-postérieure du mésoderme :	9
4. Segmentation dorso-ventrale du mésoderme :	10
IV. Régulation de la myogenèse embryonnaire :	11
1. Le déterminant myogénique Twist :	11
2. Fonctions myogéniques du facteur de transcription Mef 2 :	13
V. Description de la paroi musculaire :	15
1. Organisation de la paroi musculaire :	15
2. Nomenclature de la paroi abdominale :	16
VI. Spécification des précurseurs musculaires :	16
1. Origine des muscles somatiques :	16
2. Identification de marqueurs : vers un modèle de cellules « fondatrices » musculaires :	17
3. Les gènes d'identité musculaire :	18
4. Combinatoire d'expression des facteurs de transcription d'identité :	20
5. Influence des gènes neurogéniques :	22
6. Détermination des groupes d'équivalence :	22
7. Rôle des voies N, EGF, FGF, Wg et Dpp :	24
8. Régulation des divisions des progéniteurs :	25
9. Les myoblastes compétents à la fusion :	26
VII. Formation des fibres musculaires :	28
1. La fusion des myoblastes :	28
2. Attachement des fibres musculaires :	30
VIII. Mise en place de l'innervation des fibres :	33
1. Aperçu du système nerveux moteur :	33
2. Formation des motoneurones :	34
3. Identité des motoneurones :	35
4. Guidance des axones :	36
5. Le système nerveux sensoriel et ses projections :	39

6. Les cellules gliales périphériques :	40
IX. Les précurseurs de muscles adultes ou AMPs :	41
1. Découverte et description des AMPs :	41
2. Spécification des AMPs au cours de l'embryogenèse :	43
3. Gènes d'identité des AMPs :	44
4. AMPs et répresseurs myogéniques :	44
5. La voie Notch dans les AMPs :	45
6. Morphologie et comportement des AMPs.....	46
7. Interactions entre les AMPs et le système nerveux :	47
X. Objectifs de travail	48
Résultats	49
I. Article 1 : <i>Drosophila</i> adult muscle precursor cells contribute to motor axons path-finding and proper innervation of embryonic muscles	49
II. Dissection du rôle des AMPs sur la mise en place de l'innervation :	57
1. Impact des dAMPs sur la migration de l'ISN :	59
2. Données supplémentaires sur les relations entre IAMPs et L-SNa :	60
III. Approche génétique du rôle des AMPs dans l'innervation :	63
IV. Interactions des IAMPs avec les muscles avoisinants :	66
1. Expression ectopique de molécules de guidance par les muscles :	67
2. Rôle de l'identité musculaire sur les IAMPs :	68
V. Caractérisation des AMPs au cours de l'embryogenèse :	70
1. Différences entre FCs et AMPs :	71
2. Migration et dynamique des filopodes des AMPs :	72
3. Analyse de l'expression et du rôle de <i>bib</i> dans les AMPs :	73
VI. Impact de l'absence de la SNa sur les AMPs au stade larvaire :	74
Discussion	76
I. Acteurs impliqués dans la guidance des axones par les AMPs :	77
II. Vers une identité des AMPs :	77
III. Caractérisation du rôle des gènes exprimés par les AMPs :	78
IV. Effet des voies de signalisation majeures sur les AMPs :	80
V. Un nouveau rôle pour Unc-5 :	81
VI. Interactions entre les IAMPs et les muscles :	81
Matériel et méthodes	83
I. Liste des lignées :	83

II. Anticorps utilisés :	83
III. Article 2 : Characterization of Drosophila Muscle Stem Cell-Like Adult Muscle Precursors :.....	84
Références bibliographiques	85

Liste des figures :

Figure 1: Cycle de vie de *Drosophila melanogaster*

Figure 2: Développement précoce du mésoderme

Figure 3: Subdivision du mésoderme

Figure 4: Schéma de la paroi musculaire abdominale

Figure 5: Profil d'expression des iTFs au sein des fibres musculaires

Figure 6: Détermination du destin myogénique à partir de groupes d'équivalence

Figure 7: Spécification des cellules fondatrices (FCs)

Figure 8: Mécanismes et acteurs impliqués dans la fusion des myoblastes

Figure 9: Mise en place de la jonction myotendineuse

Figure 10: Innervation de la paroi musculaire

Figure 11: Formation et division des neuroblastes

Figure 12: Régulation transcriptionnelle de la guidance des motoneurones dorsaux et ventraux

Figure 13: Neurones sensoriels périphériques embryonnaires

Figure 14: Description des cellules périphériques gliales au cours de l'embryogenèse

Figure 15: AMPs et axones moteurs restent associés en l'absence des muscles

Figure 16: La délocalisation des AMPs de la région dorsale affecte le trajet de l'ISN

Figure 17: L'apoptose des dAMPs peut induire un défaut de migration de l'ISN

Figure 18: La voie FGF influence la spécification des AMPs mais l'absence de dAMPs n'impacte pas la migration de l'ISN

Figure 19: Les lAMPs sont suffisantes pour induire la formation de la L-SNa

Figure 20: La voie EGF affecte la spécification et le comportement des AMPs

Figure 21: L'absence de Fas2 n'a pas d'effet sur le comportement des AMPs

Figure 22: L'absence de Zfh1 entraîne une perte drastique des AMPs et de la SNa

Figure 23: Les AMPs expriment Unc-5 dont la mutation peut influencer leur comportement

Figure 24: L'expression ectopique de molécules de guidance par les muscles peut affecter le comportement des AMPs

Figure 25: L'identité musculaire joue un rôle important dans la migration des IAMPs

Figure 26: Visualisation *in vivo* de la dynamique des interactions entre IAMPs et leurs partenaires musculaires

Figure 27: Le muscle VL1 est un acteur majeur de la migration des IAMPs

Figure 28: La surexpression de Mef2 dans les AMPs n'a pas d'effet sur leur comportement

Figure 29: La surexpression de Duf dans les AMPs n'est pas suffisante pour entrainer la formation de nouvelles fibres musculaires

Figure 30: Le pilote M6 est exprimé dans le système nerveux moteur

Figure 31: Les IAMPs expriment MMP1 mais son inhibition n'influence pas leur comportement

Figure 32: Profil d'expression de Bib au cours de l'embryogenèse

Figure 33: L'absence de Bib n'est pas suffisante pour bloquer la spécification des IAMPs

Figure 34: L'absence de L-SNa entraine une perte des IAMPs antérieures au 3^{ème} stade larvaire

Liste des abréviations

A2-A7 = hémisegments Abdominaux 2 à 7	Dlar = Drosophila leukocyte common antigen-related
AbdA = Abdominal A	DLM = Dorsal Longitudinal flight Muscle
AbdB = Abdominal B	dMN = dorsal MotoNeuron
aCC = anterior Corner Cell	DO = Dorsal Oblique muscle
Actine F = Actine Fibrillaire	Dpp = Decapentaplegic
ADN = Acide Désoxy-Ribonuléique	d-six4 = drosophila-six4
AMP = Adult Muscle Precursor	DT = Dorsal Transverse muscle
Amx = Almondex	Duf = Dumbfounded
Antp = Antennapedia	E(spl) = Enhancer of split
Ap = Apterous	E(spl)m6 = Enhancer of split m6
Ara = Araucan	EGF(R) = Epithelial Growth Factor (Receptor)
Arp 2/3 = Actin-Related Protein 2/3	Emc = Extra-macrochaetae
Axes A/P ou D/V = Axes Antéro-Postérieur ou Dorso-Ventral	EMS = Ethyl MethaneSulfonate
Bap = Bagpipe	es = organes sensoriels externes
BarH1/H2 = Bar homeobox genes 1 and 2	Eve = Even-skipped
BDSC = Bloomington Drosophila Stock Center	Eya = Eyes-absent
Beat = Beaten path	Fas = Fasciclin
bHLH = basic Helix-Loop-Helix	FC = Founder Cell
Bib = Big brain	FCM = Fusion Competent Myoblast
BMP = Bone Morphogenetic Protein	FGF = Fibroblast Growth Factor
bp = neurones exhibant des dendrites bipolaires	Fly-FUCCI = Fly-Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator
CAM = Cell Adhesion Molecules	Fra = Frazzled
Caps = Capricious	FT = Facteur de Transcription
Cas = Castor	GAL-4 = Galactose-induced regulatory protein 4
Caup = Caupolican	GAL-80 = Galactose/lactose metabolism regulatory protein 80
CF-2 = Chorion Factor-2	GATA = séquence consensus 5'-[AT]GATA[AG]-3'
ch = organes chordotonaux	GE = Groupe d'Equivalence
ChIP-on-chip = Chromatin Immuno Precipitation-on-chip	GFP = Green Fluorescent Protein
CNS = Central Nervous System	Gli/gcm = glide/glial cell missing
COE = Collier, EBF, Olf-1	GMC = Ganglion Mother Cell
Col = Collier	Grn = Grain
Con = Connectin	Gro = Groucho
CRISPR/Cas9 = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated protein 9	G-TRACE/i-TRACE = GAL4/RNAi Technique for Real-time And Clonal Expression
CRISPRa = CRISPR activation	Hb = Hunchback
CyO = Curly of Oster	Hb9 = Homeobox gene 9
Da = Daughterless	Hbs = Hibris
DA = Dorsal Acute muscle	Hh = Hedgehog
da = neurones présentant une arborisation dendritique	Him = Hole in muscle
dAMP = dorsal AMP	Hox = Homeobox
dILP6 = drosophila Insulin-Like Peptide 6	Htl = Heartless
DI = Delta	Ib = I-big
dIAMP = dorso-lateral AMP	IG = Immunoglobulines

Insc = Inscutable
Is = I-small
ISN = branche de l'ISN qui innerve les muscles dorsaux et dorso-latéraux
ISN = Intersegmental Nerve
ISNb et ISNd = branches de l'ISN qui innervent les muscles ventraux
iTF = identity Transcriptional Factors
Kr = Krüppel
L'sc = Lethal of scute
L1, L2 et L3 = stades larvaires 1, 2 et 3
LacZ = β -galactosidase (opéron lactose)
IAMP = lateral AMPs
Lb = Ladybird
LBD = PG12 = Lateral Bipolar Dendrite
Lch1 = Lateral ch 1
LexA/LexAop = LexA/LexA operator
LIM = Lin11, Isl-1, Mec-3
LL = Lateral Longitudinal muscle
Lmd = Lame duck
IMN = lateral MotoNeuron
Lms = Lateral muscles scarcer
LO = Lateral Oblique muscle
LRR = Leucin-Rich Receptor
Lrt = Leucine-rich tendon-specific protein
LT = Lateral Transverse muscle
MA = Muscle Alaïre
MADS-box = MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF-box
MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinase
MARCM = Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
Mbc = Myoblast city
md = neurones multidendritiques
MEC = Matrice Extra-Cellulaire
Mef2 = Myocyte enhancer factor 2
MHC = Myosin Heavy Chain
Mid = Midline
MiMIC = Minos-Mediated Integration Cassette
MIST = Molecular Interaction Search Tool
MMP = Matrice Métalloprotéase
MN = Motor Neuron
Mp20 = Muscle protein 20
MRF = Myogenic Regulatory Factor
Msh = Muscle segment homeobox
Msp0 = M-spondin
MTJ = MyoTendinous Junction
MyoD = Myogenic Differentiation
N = Notch
Nau = Nautilus
NetA et NetB = Netrin A et Netrin B
Neur = Neuralized

NF- κ B = Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NIG-Japan = National Institute of Genetics-Japan
Nkx = Nirenberg and Kim homeobox
NMJ = Neuro-Muscular Junction
Noc = No ocelli
ORF = Open Reading Frame
Org-1 = Optomotor-blind-related-gene-1
PAR-domain b-ZIP = Proline and Acidic amino acid-Rich-domain basic leucine Zipper
Pax = *Paxillin*
PC = Progenitor Cells
PDP1 = PAR Domain Protein 1
PDZ = PSD-95, Discs Large, Zo-1
PG = Peripheral Glial cells
PlexA et PlexB = Plexin A et Plexin B
PNS = Peripheral nervous System
Pou = Pou domain protein
Poxm = Pox meso
PS2 = Position-Specific Antigen 2
Ptp52F = Protein tyrosine phosphatase 52F
Ptp69D = Protein tyrosine phosphatase 69D
Ptx1 = Pituitary homeobox 1
Pyr = Pyramus
Repo = Reverse polarity
RNAi = RNA interference
RP2 et RP3 = Motoneurones
Rst = Roughest/Irregular-optic-chiasma-C
Run = Runt
S59 = Slouch
SBM = Segment Border Muscle
SCAR = Suppressor of cAMP Receptors
Scr = Sex comb reduced
Sd = Scalloped
Segment A = segment Abdominal
Segment T = segment Thoracique
SF = Synapse Fusogénique
Side = Sidestep
Slp = Sloppy-paired
SN = Segmental Nerve
SNa = branche du SN qui innerve les muscles externes latéraux
Sna = Snail
SNc = branche du SN qui innerve les muscles externes ventraux
Sns = Stick and stones
So = Sine oculis
Spi = Spitz
Sr = Stripe
Srp = Serpent
Su(H) = Suppressor of Hairless

T2A-GAL4 = Peptide 2A du virus de l'insecte
Thosea asigna-GAL4
td = neurones qui innervent les trachées
Tey = Teyrha-Meyhra
Ths = Thisbe
TIMP = Tissu Inhibitor of Metalloproteinases
Tin = Tinman
TN = Transverse Nerve
TRiP = Transgenic RNAi Project
Trn = Tartan
TSP = Thrombospondin
Tup = Tailup/Islet
Twi = Twist
UAS = Upstream Activating Sequence
Ubx = Ultrabithorax

Unc-5 = Uncoordinated-5
VA = Ventral Acute muscle
vAMP = ventral AMP
VDRC = Vienna Drosophila RNAi Center
Vg = Vestigial
VI = Ventral Interne muscle
VL = Ventral Longitudinal muscle
vMN = ventral MotoNeuron
VO = Ventral Oblique muscle
VT = Ventral Transverse muscle
WASp = Wiskott–Aldrich Syndrome protein
Wg = Wingless
WRPW = domaine constitué de Trp-Arg-Pro-Trp
Zfh1 = Zinc finger/homeodomain protein 1

Introduction

I. Le modèle drosophile :

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830), insecte modèle du genre *Drosophila* (Fallén, 1823), est un holométabole de l'ordre des Diptères couramment utilisé par la recherche scientifique depuis plus d'un siècle. A l'heure actuelle, les travaux portant sur cet organisme parmi les plus simples utilisés en laboratoire ont reçu 6 prix Nobels récompensant des découvertes majeures dans de nombreuses disciplines. L'influence du modèle drosophile s'étend ainsi de l'étude du cycle circadien (Jeffrey Hall, Michael Rosbash et Michael Young, prix Nobel en 2017), au contrôle génétique du développement embryonnaire (Edward B Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, et Eric F Wieschaus, prix Nobel en 1995), en passant par de nombreux autres domaines tel que l'immunité innée (Jules A Hoffmann, prix Nobel en 2011). Cependant, lorsque l'on parle de ce puissant modèle, on se doit de mentionner les travaux pionniers de Thomas Hunt Morgan. Ses études ont non seulement permis la compréhension des mécanismes de l'hérédité (Morgan T, 1915 ; prix Nobel en 1933), mais il a aussi pu mettre en place les bases de ce qu'est aujourd'hui l'utilisation de la drosophile ainsi que la génétique dans son ensemble. Parmi ses nombreuses contributions, on peut par exemple citer l'identification de *Notch* qui fut découvert en 1914 et cartographié en 1917 par Morgan T. et Dexter J. De nos jours, la signalisation Notch est encore l'une des voies les plus étudiées de par son implication dans nombre de processus biologiques et sa conservation au cours de l'évolution.

Brièvement, la drosophile est un modèle génétique simple présentant de nombreux avantages. D'un point de vue pratique, les drosophiles possèdent un temps de génération court (10 jours à 25°C), de nombreux descendants (plus de 300 œufs par femelle fécondée), une durée de vie d'environ 2 mois, et des coûts de maintenance faibles. Son génome est entièrement séquencé (Adams *et al.*, 2000 ; Myers *et al.*, 2000) mais aussi soumis à de nombreuses nouvelles annotations (actuellement 6^{ème} version (dos Santos *et al.*, 2015)). Ainsi la drosophile possède environ 17 600 gènes annotés pour environ 14 000 gènes codant pour une protéine. Ces gènes sont répartis sur 4 paires de chromosomes, une première sexuelle (1) et 3 autosomiques (2, 3 et 4). Cependant, le chromosome 4 est de petite taille

(environ 3,5% du génome total) et majoritairement constitué d'hétérochromatine, on parle de « dot chromosome ». D'un point de vue évolutif, approximativement la moitié des séquences protéiques de la drosophile possèdent un homologue chez l'Homme (Friedman et Hughes 2001) et environ 75% des gènes impliqués dans une maladie humaine possèdent un orthologue chez la drosophile (Reiter *et al.*, 2001).

L'une des forces de ce modèle consiste en l'utilisation de chromosomes dits « balanceurs » afin de préserver la transmission des mutations homozygotes délétères en empêchant les recombinaisons méiotiques. Ces chromosomes possèdent de nombreuses inversions, des mutations délétères récessives ainsi que des marqueurs phénotypiques facilement identifiables. Par exemple, les drosophiles portant le chromosome balancier Curly of Oster (CyO) présentent des ailes recourbées grâce à une mutation dans le gène *Dual oxidase* (Ward 1923 ; Hurd *et al.*, 2015). Les inversions inhibent la formation de crossing-over à proximité des points de cassure (Gong *et al.*, 2005), et les recombinaisons simples au niveau de ces chromosomes produisent des gamètes aneuploïdes qui ne peuvent aboutir à une progéniture viable. En revanche, il est rare mais possible de voir la formation de double crossing-over entre deux points d'inversions éloignés. Il est donc recommandé d'adapter l'utilisation d'un balancier possédant un point d'inversion le plus proche possible de la région d'intérêt. Il est important de noter que ces outils bien qu'indispensables à la communauté drosophile ne sont pas « immunisés » à une certaine dérive génétique et doivent être contrôlés (Miller *et al.*, 2016).

Le modèle drosophile est activement supporté par l'existence de nombreux outils tels que les systèmes d'expression GAL4/UAS et LexA/LexAop, les analyses de lignages avec les systèmes MARCM, G-TRACE/i-TRACE, ou encore de nombreux rapporteurs LacZ, MiMIC et autres Fly-FUCCI pour suivre le cycle cellulaire, *etc.* A ces derniers s'ajoute l'existence de collections de lignées RNAi (VDRC, Transgenic RNAi Project (TRiP), NIG-Japan), mutantes (EMS ou insertions de transposons), ou encore des lignées présentant des déficiences/duplications couvrant la majeure partie du génome, *etc.* Il serait difficile de faire une liste exhaustive de l'ensemble des outils mis à disposition des chercheurs par la communauté. Une majorité de ces lignées sont accessibles grâce à la banque de lignées Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) (Cook *et al.*, 2010). A ceci s'ajoutent de nombreuses collections de lignées différentes qui ont pour but d'améliorer le panel d'outils

déjà existants. Parmi ces dernières, on peut citer les collections de régions activatrices de la transcription associées à l'expression de GAL-4 de Janelia Farm (Pfeiffer *et al.*, 2008), Vienna Tiles (Jenett *et al.*, 2012) ou les T2A-GAL4 récemment mises à disposition (Lee *et al.*, 2018). Ces collections mettent à disposition de très nombreuses lignées GAL-4 induisant une expression spatiale et temporelle spécifique dans la plupart des tissus de la drosophile. L'expression du GAL-4 est alors conjuguée à l'utilisation de séquences UAS (Upstream Activating Sequence) permettant l'expression de séquences choisies placées en aval de l'UAS (Brand et Perrimon 1993). On peut notamment citer l'initiative FlyORF qui met à disposition une collection d'ORFs (Open Reading Frame) de nombreux gènes de la drosophile en aval de séquences UAS (Bischof *et al.*, 2013). Ce système binaire GAL-4/UAS constitue l'une des plus grandes forces du modèle drosophile de par le très grand nombre de lignées inductrices GAL4 et inductibles UAS aujourd'hui à la disposition des chercheurs. Ce système simple s'est aussi vu amélioré par l'addition de lignées GAL-80 permettant l'inhibition du GAL-4 (Lee et Luo 1999) ou encore la création de lignées split GAL-4 basées sur le principe de reconstitution du GAL-4 à l'intersection de deux lignées inductrices (Luan *et al.*, 2006).

De plus, ce modèle présente aussi l'avantage de s'approprier très rapidement les nouvelles technologies. Le meilleur exemple est la vitesse à laquelle la communauté drosophile a pu adapter son modèle à la technologie CRISPR/CAS9. Ce système d'édition du génome est aujourd'hui utilisé en routine et propose de nouveaux outils allant de l'obtention de nouveaux mutants spécifiques en quelques mois (Kondo et Ueda 2013 ; Port et Bullock 2016) à l'utilisation d'activateurs de la transcription basés sur le CRISPR/Cas9 (CRISPRa) (Ewen-Campen *et al.*, 2017 ; Jia *et al.*, 2018). En utilisant le CRISPR/Cas9, le modèle drosophile a permis entre autre de développer le « gene drive » permettant la transmission non-mendélienne d'allèles au sein d'une population (Gantz et Bier, 2015 ; Gantz *et al.*, 2015). Les applications de cette technologie n'en sont encore qu'à leur début mais permettent d'ores et déjà d'envisager des avancées majeures pour les années à venir.

Il est aussi nécessaire de mentionner la large contribution apportée par le site Flybase (<http://flybase.org/>) qui constitue aujourd'hui la plus large banque de données sur le génome de la drosophile. Ce site indispensable procure notamment des données fiables sur les informations et les ressources disponibles pour les différents gènes individuels de la drosophile. En parallèle, de nombreux outils informatiques ont été développés pour

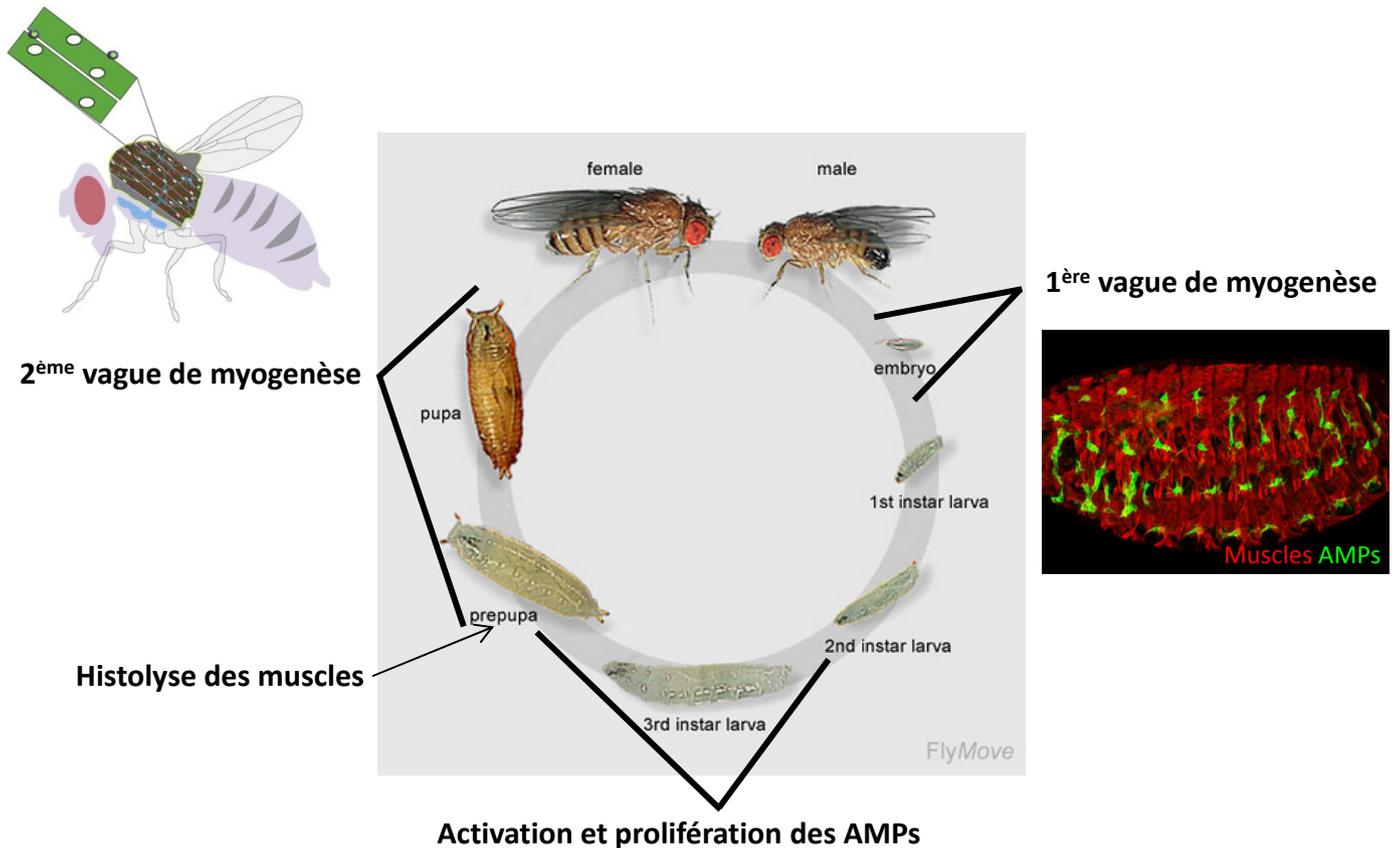


Figure 1: Cycle de vie de *Drosophila melanogaster*

Le cycle de vie de la drosophile se divise en quatre phases : embryonnaire, larvaire, pupale et adulte (appelée aussi imago). La phase larvaire se divise elle-même en 3 stades (ou instars) L1, L2 et L3, séparés par deux mues successives. Les muscles larvaires sont mis en place au cours de l'embryogenèse (en rouge, révélés par un marquage $\beta 3$ -Tubuline), et continueront à croître au cours de la vie larvaire. Après histolyse des muscles, dès le début de la phase pupale, les muscles adultes seront formés à partir de cellules Précurseurs de Muscles Adultes (AMPs) spécifiées dès l'embryogenèse (en vert, révélées par un transgène M6-GapGFP). Les AMPs sont tout d'abord quiescentes, puis se réactivent et prolifèrent à partir de la moitié du stade L2. Le schéma montre des muscles de vol adultes associés aux cellules satellites récemment découvertes. Adapté de <http://flymove.uni-muenster.de/> ; Gunage *et al.*, 2017.

supporter la génération de grands jeux de données suite à la démocratisation des séquençages et analyses protéomiques à grande échelle. Parmi ces outils on peut citer des sites tels que FlyMine (Lyne *et al.*, 2007) permettant de gérer et visualiser de longues listes de gènes ou encore la base de donnée MIST basée sur la visualisation d'interactions protéiques et facilitant les comparaisons entre des jeux de données nouveaux et préexistants (Hu *et al.*, 2018).

Ainsi, le modèle drosophile, bien que présent depuis plus de 100 ans, reste en constante évolution et activement supporté par un nombre croissant d'outils et une large communauté. Ces avantages en font un modèle parfaitement adapté pour l'analyse fonctionnelle. La conservation des processus biologiques au cours du développement a déjà permis à de nombreux mécanismes, tels que l'embryogenèse ou encore les voies de signalisation majeures, d'être disséqués chez la drosophile. Au sein de ces processus, l'étude chez la drosophile de la formation des muscles ou myogenèse a permis de grandes avancées.

II. Aperçu de la myogenèse chez la drosophile :

La myogenèse chez la drosophile s'effectue en deux vagues distinctes au cours de son cycle de vie (Figure 1). Les muscles larvaires sont spécifiés au cours de l'embryogenèse. Les muscles sont formés à partir de la fusion asymétrique de deux populations distinctes de myoblastes, toutes deux spécifiées à partir du mésoderme. On distingue des cellules dites fondatrices ou FCs qui portent toutes l'information nécessaire à la formation, l'attachement et l'innervation du muscle. Ces FCs vont ensuite fusionner avec un nombre déterminé de myoblastes compétents à la fusion ou FCMs. A la fin de la phase embryonnaire, on observe la formation d'un pattern répété et constant de 30 muscles par hémisegment (souvent décrit comme un segment) abdominal (A2-A7). Les muscles ainsi formés sont monofibrillaires et s'attachent à l'épiderme via des cellules tendons. Ces muscles sont entre autres responsables de la locomotion chez la larve. Chez la drosophile, la vie larvaire dure approximativement 5 jours. On distingue trois stades, aussi appelés instars, L1, L2 et L3. Pendant cette période, la larve va croître drastiquement, les muscles peuvent notamment croître jusqu'à atteindre 50 fois leur taille initiale sans changer de nombre (Demontis et Perrimon 2009). Puis, la larve entre en métamorphose au cours de la phase dite pupale (d'une durée de 5 jours) afin de former la future mouche adulte.

En parallèle de la formation des muscles, une sous population de myoblastes appelée précurseurs de muscles adultes (AMPs) est spécifiée. La répartition des AMPs chez la larve est établie au cours de l'embryogénèse de manière stéréotypée : on distingue 6 AMPs par hémisegment abdominal et 6 à 10 pour les segments thoraciques. Après spécification et jusqu'au début du deuxième stade larvaire, les AMPs sont maintenues dans un état de quiescence, au cours duquel les AMPs sont en contact étroit avec les fibres musculaires formant ainsi une « niche » indispensable à leur survie. A partir du deuxième stade larvaire, la sécrétion de dILP6 (drosophila Insulin-Like Peptide 6) par les muscles avoisinants est responsable de la réactivation des AMPs (Aradhya *et al.*, 2015). Après une phase initiale de prolifération (Gunage *et al.*, 2014), les AMPs seront à l'origine de la formation des muscles multi-fibrillaires adultes, proches de ceux des vertébrés, lors du développement pupal (Currie et Bate 1991).

Au cours de la phase pupale, les muscles larvaires sont pour la plupart dégradés par histolyse via apoptose induite par le récepteur à l'ecdysone (Zirin *et al.*, 2013). Après amplification, les AMPs forment les muscles adultes soit *de novo*, soit par fusion avec des fibres musculaires persistantes telles que les muscles dorsaux obliques dans les segments thoraciques T2 qui participeront à la formation des futurs muscles de vol dorso-longitudinaux ou DLMS (Fernandes *et al.*, 1991 ; Farrell *et al.*, 1996). Les AMPs indifférenciées vont former les nouveaux muscles adultes multifibrillaires en fusionnant entre elles. Cette étape requiert la sélection parmi les AMPs de cellules fondatrices reconnaissables par une forte expression de la protéine d'adhésion Dumbfounded (Duf) (Dutta *et al.*, 2004). Ces cellules fondatrices sont recrutées par l'action de signaux FGFs (Facteur de croissance des fibroblastes) provenant en partie du système nerveux (Dutta *et al.*, 2005 ; Sarkissian *et al.*, 2016). Ces cellules fondatrices de la myogenèse adulte sont requises pour déterminer le nombre de fibres formées mais ne sont pas nécessaires pour le processus de fusion *per se* (Atreya et Fernandes 2008).

Il est aussi intéressant de noter qu'un nouveau type cellulaire a récemment été découvert. L'étude approfondie de la musculature adulte a permis d'identifier une population de cellules musculaires dormantes juxtaposées aux fibres musculaires (Chaturvedi *et al.*, 2017 ; Boukhatmi et Bray 2018). Ces cellules sont originaires des AMPs et sont caractérisées par l'activation de la voie Notch ainsi que par l'expression du facteur de transcription à doigt de

zinc et homéodomaine Zfh1. Ce qui distingue cette nouvelle population est qu'elle possède une capacité de proliférer et de participer à la régénération des muscles d'une façon similaire aux cellules satellites (Mauro 1961) déjà bien connue chez les vertébrés. Ces cellules satellites sont d'une importance majeure car elles constituent la population majoritaire de cellules souches musculaires permettant la régénération des muscles. Elles sont la cible de nombreuses investigations aussi bien fondamentales que thérapeutiques.

Dans ce contexte, l'étude des processus complexes de la myogenèse chez la drosophile a permis de mettre en place de nombreuses bases indispensables à la compréhension de ces mêmes mécanismes chez les vertébrés. En effet, il existe une forte conservation de ces processus avec ceux décrits chez les vertébrés (voir revue M Taylor 2013). Qu'il s'agisse de la fusion, de la spécification des myoblastes, de la mise en place des sous-unités contractiles ou encore de l'attachement des muscles, le modèle drosophile a déjà apporté une contribution majeure à la compréhension de ces différents mécanismes. Ainsi, la drosophile se présente comme un modèle de choix pour étudier de nouvelles questions relatives aux processus myogéniques. L'étude des cellules satellites au cours de l'embryogenèse reste encore un domaine complexe à étudier chez d'autres organismes vertébrés. Or, les AMPs, présentes chez la drosophile dès l'embryogenèse, représentent un bon modèle pour améliorer notre compréhension des cellules souches musculaires au cours des étapes précoces du développement (Figeac *et al.*, 2007). Dans cette perspective, ce projet s'est centré sur l'étude du comportement et des interactions des AMPs au cours de l'embryogenèse. Cependant, afin de mieux comprendre l'origine et l'environnement de ces cellules, il est nécessaire d'introduire en détail la mise en place de la musculature au cours de l'embryogenèse.

III. Mise en place des muscles somatiques :

1. Embryogenèse chez la drosophile :

Les premières études sur les muscles des larves suggèrent une origine embryonnaire des muscles (Hertweck 1931). L'embryogenèse chez la drosophile se déroule pendant 22-24h à 25°C. D'un point de vue structurel, l'embryon est enveloppé d'une fine membrane interne l'enveloppe vitelline, et d'une épaisse couche externe protectrice appelée chorion. Au cours du développement de l'embryon, ce dernier subit de nombreux événements caractéristiques afin de mettre en place les différentes structures et organes qui composeront la larve. Certains de ces processus sont visuellement identifiables tels que l'extension et la rétractation de la bandelette germinative, ou encore la segmentation de l'embryon. Afin de simplifier l'étude du développement embryonnaire, les différentes étapes ont été répertoriées et classées en différents « stades » (Campos-Ortega et Hartenstein, 1985). On en compte 17 qui s'étendent jusqu'à l'éclosion d'une larve. Au cours du développement, la myogenèse embryonnaire commence à partir du stade 5 par la formation du mésoderme et continue jusqu'au stade 16 avec l'innervation des fibres musculaires et la mise en place des unités contractiles, les sarcomères.

2. Mise en place du mésoderme :

Chez la drosophile les muscles somatiques, comme les muscles squelettiques des vertébrés, proviennent de la subdivision du mésoderme (Poulson 1950). Le mésoderme est un tissu formé au cours de la première étape de la gastrulation. Il s'agit alors d'une couche de cellules tapissant la paroi interne de l'ectoderme de l'embryon. Ces cellules proviennent de l'invagination puis de la migration des cellules ventrales du blastoderme (Figure 2A). Au cours de l'embryogenèse, les cellules constituant le mésoderme formeront la plupart des organes internes (Campos-Ortega et Hartenstein, 1985). On distingue quatre structures distinctes formées à partir du mésoderme : les muscles viscéraux, somatiques, le muscle cardiaque ainsi que le corps gras.

Le mésoderme est donc déterminé au cours de la gastrulation chez l'embryon (stade 5 de développement). A ce stade, l'embryon est composé d'environ 5000 cellules mais ne présente pas encore de mouvements morphogénétiques. Au début de la gastrulation, les

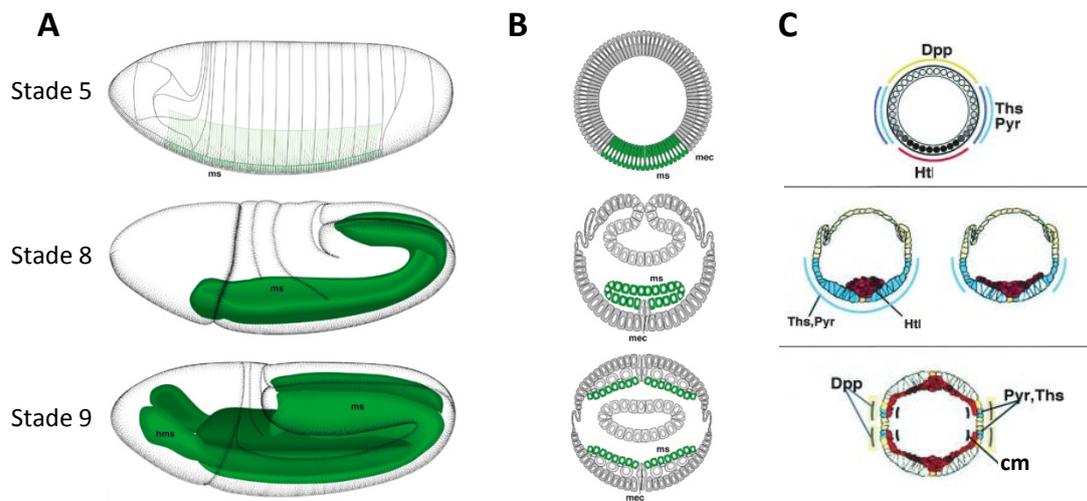


Figure 2: Développement précoce du mésoderme

Le mésoderme (ms) se forme à partir des cellules ventrales du blastoderme sous l'impulsion des gènes *twist* et *snail*. Après invagination, le mésoderme migre au cours de l'extension de la bandelette germinative (A). En parallèle, le mésoderme colonise la face interne de l'ectoderme (B). Cette migration dorsale est sous le contrôle de l'expression progressivement restreinte des ligands Thisbe (Ths) et Pyramus (Pyr), reconnus par le récepteur Heartless (Htl) exprimé par les cellules mésodermes (C). Adapté de Atlas of drosophila development, Volker Hartenstein ; Stathopoulos et al., 2004. Dpp : Decapentaplegic, cm : mésoderme cardiaque.

cellules les plus ventrales, sous l'influence de la protéine Dorsal (l'homologue de NF- κ B), déposée maternellement dans l'embryon, vont s'invaginer. La protéine Dorsal est présente dans l'embryon précoce sous forme de gradient subcellulaire participant à l'établissement de l'axe dorso/ventral (Roth *et al.*, 1989; Rushlow *et al.*, 1989; Steward 1989). Les cellules les plus ventrales formant le mésoderme présomptif expriment Dorsal. Ce dernier est transporté dans le noyau et va alors activer plusieurs gènes zygotiques dont *twist* (*twi*) (Thisse *et al.*, 1987 ; Thisse *et al.*, 1991) et *snail* (*sna*) (Ray *et al.*, 1991 ; Ip *et al.*, 1992), qui codent pour deux facteurs de transcription indispensables à l'invagination du mésoderme (Simpson, 1983 ; Grau *et al.*, 1984 ; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). Au cours de ce processus, ces deux gènes sont nécessaires mais ont cependant des rôles et profils d'expression spécifiques (Leptin, 1991 ; Kosman *et al.*, 1991). Le facteur de transcription à doigt de zinc Snail (Boulay *et al.*, 1987) permet entre autres de réprimer les gènes du neurectoderme et mésectoderme tel que *single-minded* (Kasai *et al.*, 1992). Son expression restreinte au mésoderme forme ainsi une frontière nette avec le mésectoderme. Parallèlement, l'expression du facteur de transcription de type bHLH Twist est plus étendue et forme un gradient ventro-latéral. En effet, on retrouve Twist fortement exprimé dans le mésoderme présomptif et plus faiblement dans le mésectoderme adjacent ainsi que dans quelques cellules du neurectoderme. Au sein du mésoderme, Twi agit comme le principal régulateur contrôlant l'expression de nombreux gènes d'identité du mésoderme tels que *snail* lui-même, *tinman* ou encore *α PS2integrin* (Bodmer *et al.*, 1990 ; Leptin, 1991). L'invagination du mésoderme présomptif forme une structure dite en fourreau qui va ensuite aboutir à un tube internalisé (Turner et Mahowald, 1977 ; Fullilove *et al.*, 1978). Le mésoderme ainsi formé est alors composé de cellules engagées dans un destin mésodermal mais ne possédant pas encore de restrictions sur leur potentiel de développement (Beer *et al.*, 1987). Sous l'influence de nombreux facteurs, les cellules vont acquérir une identité propre au sein du mésoderme. Cette restriction commence au cours de la migration dorsale du mésoderme. Après l'invagination du mésoderme présomptif, les cellules subissent une transition d'épithélium en mésenchyme (Oda *et al.*, 1998), prolifèrent et commencent à migrer dorsalement le long de la paroi interne de l'ectoderme (Figure 2B). Cette migration s'effectue sous le contrôle de la voie FGF par le biais du récepteur Heartless (Htl) exprimé uniformément dans le mésoderme (Beiman *et al.*, 1996; Gisselbrecht *et al.*, 1996 ; Shishido *et al.*, 1997). Les ligands de Htl, Thisbe (Ths) et Pyramus (Pyr) (de type FGF8-like) ont une

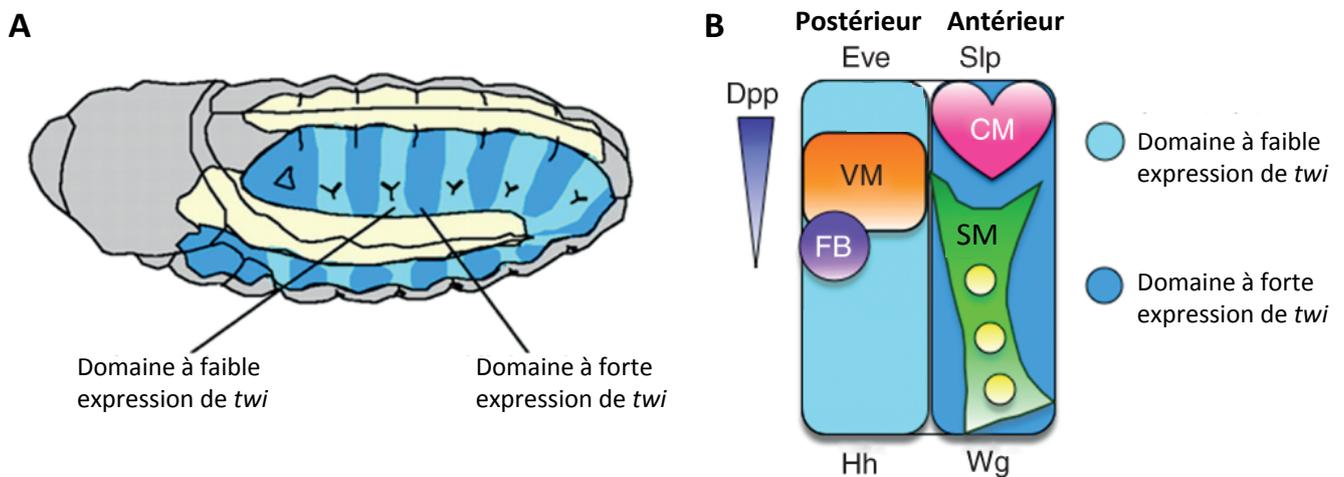


Figure 3: Subdivision du mésoderme

Suite à la migration, le mésoderme se subdivise sous l'influence des voies de signalisation Hedgehog (Hh), Wingless (Wg) et Decapentaplegic (Dpp). Chaque parasegment est alors constitué d'un domaine Postérieur (P) exprimant faiblement *twi*, et d'un domaine Antérieur (A) à forte expression de *twi* (A). Ces domaines sont ensuite eux-mêmes régionalisés et formeront : le corps gras (FB) et le mésoderme viscéral (VM) pour le domaine P, ainsi que les mésodermes cardiaque (CM) et somatique (SM) pour le domaine A (B). Adapté de Dobi *et al.*, 2015.

expression ectodermique et progressivement restreinte à l'ectoderme dorsal (Stathopoulos *et al.*, 2004). Cette dynamique d'expression permet la migration et la formation d'une monocouche de cellules le long de l'ectoderme (Figure 2C). Le mésoderme est ensuite lui-même divisé en parasegments partiellement chevauchants avec ceux de l'ectoderme (Martinez-Arias et Lawrence, 1985 ; Riechmann *et al.*, 1997). Au sein d'un parasegment, le mésoderme est à nouveau divisé en quatre territoires primordiaux selon l'axe antéro-postérieur (A/P) et l'axe dorso-ventral (D/V).

3. Division antéro-postérieure du mésoderme :

Les premières descriptions de la subdivision du mésoderme ne font pas clairement mention d'une régionalisation dépendante de l'axe A/P (Bate, 1993). On décrit alors le devenir du mésoderme en fonction des couches de cellules qui le constituent. Après la phase de migration, les cellules se divisent à nouveau et s'organisent en deux couches. Les cellules internes donneront le corps gras et les muscles viscéraux, alors que celles de la couche externe en contact avec l'épiderme formeront les mésodermes cardiaque et somatique. Cette vision a pu être raffinée à partir de 1995 grâce à l'étude du profil d'expression du gène *twi* au cours de la détermination du mésoderme ainsi que par la découverte de nouveaux marqueurs (Figure 3A).

Après invagination, l'expression de *twist* s'éteint dans l'ectoderme et le mesectoderme mais persiste dans le mésoderme de façon uniforme. Ce profil d'expression est ensuite raffiné afin d'obtenir au sein de chaque parasegment un domaine antérieur (A) exprimant fortement *Twist* et un domaine postérieur (P) avec une faible expression de *twist* (Borkowski *et al.*, 1995, Baylies et Bate, 1996). Cette expression différentielle est établie sous le contrôle des gènes de segmentation *even-skipped (eve)* (Azpiazu *et al.*, 1996) et *sloppy-paired (slp)* (Grossniklaus *et al.*, 1992; Riechmann *et al.*, 1997). Le domaine P est sous le contrôle d'*eve* qui va activer le gène à homéoboîte *engrailed* (Kornberg *et al.*, 1985 ; Tremml et Bienz 1989) ainsi que la protéine de signalisation Hedgehog (Hh) dans l'ectoderme (Taylor *et al.*, 1993 ; Riechmann *et al.*, 1997). Leur combinaison induit l'activation des gènes *bagpipe (bap)* pour le mésoderme viscéral (Azpiazu and Frasch, 1993) et de *serpent (srp)* pour le primordium du corps gras (Abel *et al.*, 1993) (Figure 3B). En parallèle, la voie Notch (N) est activée dans ce domaine et va permettre la répression de *twi* probablement via la protéine HLH Extra-

macrochaetae (Emc) (Brennan *et al.*, 1999 ; Tapanes-Castillo et Baylies 2004). Le domaine A exprime *slp*, induit par le morphogène Wingless (Wg) (homologue de Wnt chez les vertébrés) sécrété par l'ectoderme et lui-même induit par le Slp ectodermal (Lee et Frasch, 2000). L'expression de *wg* permet de restreindre l'expression *srp* et *bap* au domaine P. L'analyse des mutants a permis de montrer que la combinaison de *wg* et *slp* dans le mésoderme est requise pour l'activation et le maintien de *twi*. Ce domaine A est à l'origine de la formation du mésoderme cardiaque en position dorsale et du mésoderme somatique (Figure 3B). A partir du stade 11, les cellules du domaine P commencent à s'internaliser et les cellules du domaine A vont progressivement recouvrir l'ensemble du parasegment en contact avec l'ectoderme (voir appendix Riechmann *et al.*, 1997).

4. Segmentation dorso-ventrale du mésoderme :

La détermination du mésoderme dorsal qui donnera les muscles viscéraux et cardiaque est mise en place sous l'influence de la protéine Decapentaplegic(Dpp), homologue des BMPs (Bone Morphogenic Proteins) chez les vertébrés, exprimée au niveau de l'ectoderme dorsal (Staehling-Hampton *et al.*, 1994). Le mésoderme exprime le récepteur Thickvein (Penton *et al.*, 1994) qui va alors permettre la restriction de l'expression du facteur de transcription de type Nkx Tinman (Tin) (Frasch, 1995). L'expression de *tin* est tout d'abord retrouvée dans l'ensemble du mésoderme, puis est maintenue uniquement dans la région dorsale grâce au signal Dpp. Cette expression dorsale de *tin*, couplée au signal Dpp permet l'expression du marqueur viscéral *bap*. La détermination du cœur, des muscles viscéraux mais aussi de certains muscles somatiques dorsaux est dépendante de l'expression de *tin* (Bodmer 1993 ; Azpiazu and Frasch, 1993). En parallèle, la voie Dpp permet aussi la répression du gène *poxmeso* (*poxm*) qui est donc restreint au mésoderme ventral (Staehling-Hampton *et al.*, 1994). *Poxm* est un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes possédant un domaine paired. Son rôle au sein du mésoderme est complexe car il agit à plusieurs niveaux au cours de la myogenèse (Duan *et al.*, 2007). Le gène *d-six4* a lui aussi été identifié comme exprimé spécifiquement dans le mésoderme ventral (Clark *et al.*, 2006). *D-six4* est un facteur de transcription de la famille Six qui présente une expression ventrale complémentaire à celle de Tin. L'expression de *d-six4* est requise pour la spécification correcte du corps gras et de certains muscles dorso-latéraux et ventraux.

Pour résumer, les muscles somatiques sont issus des domaines antérieurs de chaque parasegment du mésoderme. L'intersection des signaux Wg et Slp permet de maintenir une forte expression de Twi. Sous l'influence de Dpp, ce territoire est lui-même subdivisé par l'expression de Tin. On peut donc distinguer une identité dorsale par l'expression de Tin et une identité ventrale avec celle de Poxm et D-six4. En revanche, les muscles somatiques sont issus du mésoderme somatique mais aussi du mésoderme cardiaque pour les muscles dorsaux. L'expression de Twi apparaît alors comme le principal déterminant pour l'acquisition du destin musculaire.

IV. Régulation de la myogenèse embryonnaire :

1. Le déterminant myogénique Twist :

Le gène *twist* est souvent décrit dans la littérature comme un orthologue fonctionnel du MRF (Myogenic Regulatory Factor) MyoD chez les vertébrés. En effet, il a été montré qu'en plus de son rôle dans l'invagination du mésoderme, il est aussi nécessaire pour le développement de l'ensemble des muscles somatiques (Baylies and Bate 1996). L'inhibition de *twist* après la phase de gastrulation (allèle thermosensible de *twist*) induit une absence presque totale de la formation de fibres musculaires. De plus, l'expression ectopique de *twist* dans l'ectoderme ou dans le mésoderme (domaines A et P) est suffisante pour inhiber le développement normal de ces tissus et induire l'activation du programme myogénique somatique. En revanche, son expression ectopique continue dans le mésoderme somatique n'est pas suffisante pour bloquer le processus de formation des muscles. En effet, au cours de la spécification du mésoderme somatique, l'expression de Twi diminue progressivement jusqu'à n'être exprimé que dans une sous-population de myoblastes (les Précurseurs de Muscles Adultes ou AMPs) qui resteront quiescents au cours de la majeure partie de la vie larvaire (Bate *et al.*, 1991). Or, lors de la myogenèse adulte, la diminution de Twi est nécessaire dans ces cellules après réactivation afin d'engager le programme de différenciation (Anant *et al.*, 1998). Ainsi, l'expression de Twi permet l'acquisition d'un destin myogénique mais son effet sur la différenciation des myoblastes est dépendant du contexte tissulaire.

Une explication à cette dualité d'action de Twi provient de sa capacité à se dimériser avec différents partenaires. Grâce à son domaine HLH, Twi peut se dimériser avec lui-même formant ainsi un complexe activateur du programme myogénique (Castanon *et al.*, 2001). De plus, Twi peut former un dimère avec la protéine Daughterless (Da), une protéine de type bHLH exprimée dans l'ensemble du mésoderme (Cronmiller et Cummings, 1993). Le complexe Twi/Da possède quant à lui une activité répressive sur la myogenèse (Castanon *et al.*, 2001). L'action de Twi dépend donc de l'équilibre entre les complexes activateur Twi/Twi et répresseur Twi/Da. Paradoxalement, il a été montré que la protéine Da est nécessaire à l'augmentation de la quantité de Twi au sein du mésoderme (Gonzalez-Crespo et Levine, 1993). Ainsi, Da est aussi impliquée dans la formation des domaines A et P du mésoderme. D'après le modèle actuel, l'expression d' Extra-macrochaetae (Emc) dans le domaine P sous l'influence de la voie Notch permet la formation de nouveaux dimères Da/Emc diminuant ainsi la quantité de Da disponible dans ce domaine et donc bloquant la surexpression de Twist (Tapanes-Castillo et Baylies, 2004). Plus récemment, un niveau supplémentaire de régulation des gènes par Twi a pu être mis en évidence. En effet, grâce à la protéine Akirin, Twi est capable de recruter les membres du complexe Brahma au niveau de ses gènes cibles (Nowak *et al.*, 2012). Cette interaction suggère que Twi possède la capacité de recruter des modulateurs de la chromatine au niveau de ses gènes cibles.

Le gène *twi* régule donc de nombreux processus clés régissant la mise en place et la détermination du mésoderme. Cependant avant l'année 2007, seules 11 cibles directes de Twi étaient connues telles que *tin*, *snail* ou encore *htl*. Afin de comprendre comment Twi agit au cours du développement, des études de ChIP-on-chip ont pu mettre en évidence de nouvelles cibles de Twi (Ozdemir *et al.*, 2011; Sandmann *et al.*, 2007; Zeitlinger *et al.*, 2007). Les nombreuses cibles directes identifiées (plus de 2000) sont pour la grande majorité impliquées dans la signalisation, la migration cellulaire, la prolifération ou encore la détermination du mésoderme. Cependant, même si Twi est considéré comme le régulateur principal du destin myogénique, il n'est en revanche pas directement impliqué dans la différenciation terminale des myoblastes. Cette dernière étape est principalement sous le contrôle d'une des cibles majeures de Twi, le *myocyte enhancer factor 2* ou *mef2* (Cripps *et al.*, 1998 ; Nguyen et Xu, 1998).

2. Fonctions myogéniques du facteur de transcription Mef 2 :

Le gène *mef2* code pour un facteur de transcription de type MADS-box. Ce gène fait partie des premiers gènes avec le facteur de transcription Zfh1 (Lai *et al.*, 1991) et Htl à être exprimés au sein du mésoderme présomptif suivant le profil d'expression de Twi (Lilly *et al.*, 1994 ; Nguyen *et al.*, 1994). Au cours de la subdivision du mésoderme, l'expression de *mef2* est ensuite restreinte aux mésodermes somatiques, cardiaques et viscéraux (Taylor *et al.*, 1995). Les précurseurs et les myoblastes des trois lignages myogéniques vont continuer à exprimer fortement *mef2* tout au long de la phase embryonnaire. L'analyse des mutants nuls pour *mef2* a permis de montrer son rôle crucial dans la formation des muscles (Lilly *et al.*, 1995 ; Baur *et al.*, 1995). Chez ces mutants, les muscles viscéraux et du cœur se forment mais présentent des défauts morphologiques. La perte de fonction de *mef2* induit un effet drastique sur les muscles somatiques avec une absence de fibres musculaires en bloquant la fusion des myoblastes. Mais l'expression correcte de gènes d'identité musculaires tels que *nautilus (nau)* ou *apterous (ap)* montre que *mef2* n'est pas impliqué dans la spécification des précurseurs musculaires, même si ce dernier peut se lier à leurs séquences régulatrices (Lilly *et al.*, 1995 ; Sandmann *et al.*, 2006). Dans les trois tissus, la mutation de *mef2* bloque l'expression de marqueurs de différenciation tels que la chaîne lourde de la myosine (MHC). Par la suite, il a pu être montré par des analyses génétiques et transcriptomiques que *mef2* active de nombreux gènes de structure permettant la différenciation terminale des myoblastes (Lin *et al.*, 1997 ; Kelly *et al.*, 2002 ; Sandmann *et al.*, 2006). Il est intéressant de constater que contrairement à *twi*, la surexpression de *mef2* dans le mésoderme somatique conduit à des défauts de fusion (Lin *et al.*, 1997). D'un autre côté, une expression trop faible de Mef2 conduit aussi à des défauts de la paroi musculaire (Ranganayakulu *et al.*, 1995). Ceci signifie que la mise en place du patron musculaire repose sur une fine régulation de la quantité de Mef2 (Elgar *et al.*, 2008). De plus, on sait que le contrôle de l'activité de Mef2 passe aussi par l'expression de ses co-facteurs comme le facteur de transcription PAR-domain bZIP, PDP1, impliqué entre autres dans l'activation de la *tropomyosine 1* spécifique au muscle somatique (Lin *et al.*, 1997). On peut aussi citer le facteur de transcription à doigt de zinc Chorion Factor 2 (CF-2) qui est lui impliqué dans l'activation de l'*actine 57B* ou encore dans la régulation du nombre d'événements de fusion au sein de la fibre musculaire (Tanaka *et al.*, 2008 ; Arredondo *et al.*, 2017).

Cependant, le fait que *mef2* soit exprimé tout au long de la différenciation du mésoderme sans pour autant activer le programme de différenciation musculaire suggère un autre niveau de régulation. Il a tout d'abord été montré que lors des étapes précoces de la formation du mésoderme, *mef2* ne se lie pas encore aux séquences activatrices des gènes de structure myogénique (Sandmann *et al.*, 2006 ; Junion *et al.*, 2005). De plus, durant les stades précédant la formation des muscles, *mef2* est co-exprimé avec deux répresseurs connus de la myogenèse agissant sur son activité. Le premier est le facteur de transcription à doigt de zinc et homéodomaine *Zfh1* qui agit comme un répresseur transcriptionnel de *mef2* (Postigo *et al.*, 1999). On retrouve *zfh1* fortement exprimé durant les premières étapes de la détermination du mésoderme puis son expression diminue progressivement tout en restant mutuellement exclusive avec une forte expression de *mef2* (Lai *et al.*, 1991). La mutation de *zfh1* provoque des défauts dans la paroi musculaire entraînant des pertes et des déplacements de certaines fibres (Lai *et al.*, 1993). De plus, l'absence d'expression de MHC en cas de surexpression de *zfh1* dans le mésoderme ressemble fortement au phénotype observé en cas de mutation de *mef2* (Postigo *et al.*, 1999). En 2007, la protéine Him, pour Hole in muscle, a été identifiée comme nouveau répresseur de l'activité myogénique de *mef2* (Liotta *et al.*, 2007). Ce dernier est exprimé de façon transitoire dans le mésoderme entre les stades 9 et 12. Durant cette période, l'expression de *him* est sous le contrôle de *Twi* et *Tin* (Elwell *et al.*, 2015). La protéine Him ne possède pas de site de liaison à l'ADN, en revanche celle-ci peut se lier avec le facteur répresseur Groucho (Gro) via un domaine WRPW. Le complexe Him/Gro diminue l'activité de Mef2 sur ses gènes cibles. Il est intéressant de noter que ces deux inhibiteurs de *mef2* se retrouvent fortement exprimés à partir du stade 12 dans les AMPs qui sont les seules cellules qui conservent aussi l'expression de *Twi* (Rebeiz *et al.*, 2002 ; Lai *et al.*, 1993).

Ainsi, la mise en place de la paroi musculaire à partir du mésoderme est un processus finement régulé par de nombreux facteurs myogéniques autonomes, tels que *Twi* et *Mef2* et non-autonomes comme les signaux *Wg* et *Dpp*. Or, il s'agit ici de mécanismes myogéniques généraux. Ces derniers à eux seuls ne permettent pas d'expliquer comment se forme chaque fibre de la paroi musculaire. Ou encore, comment ces fibres intègrent différents signaux qui leur indiqueront leur site d'attachement, le nombre d'événements de fusion nécessaires ou la mise en place de l'innervation spécifique. Ces processus sont mis en place à deux échelles,

une première à l'échelle de l'embryon permettant d'aboutir à différentes parois musculaires dépendantes de la position dans le thorax ou l'abdomen. Une deuxième se situe à l'échelle de la fibre, et plus particulièrement au niveau des précurseurs de ces fibres.

V. Description de la paroi musculaire :

1. Organisation de la paroi musculaire :

A partir des différents parasegments du mésoderme, on obtient *in fine* une répétition d'hémisegments possédant chacun un canevas répété d'environ 30 fibres musculaires ainsi qu'un muscle alaire. Cependant, ces mêmes processus vont engendrer la formation de parois musculaires différentes selon leur position dans l'axe A/P. Cette différence est due à l'expression différentielle des gènes homéotiques conservés au cours de l'évolution et responsables de la mise en place du schéma corporel. Ces gènes sont exprimés dans le mésoderme et vont influencer la formation de la paroi musculaire d'une façon autonome (Michelson 1994 ; Miller *et al.*, 2001). On retrouve de l'antérieur vers le postérieur : Sex comb reduced (Scr) pour le segment Thoracique 1 (T1), Antennapedia (Antp) pour les T2-T3, Ultrabithorax (Ubx) pour les segments abdominaux A1-A5 qui est co-exprimé avec Abdominal A (AbdA) dont l'expression s'étend aux segments A3 à A7, et finalement Abdominal B (AbdB) dans les segments A8-A9. Ces gènes homéotiques ont la capacité de moduler l'expression de différents facteurs de transcription au sein des précurseurs musculaires aboutissant à des changements d'identité mais aussi du nombre de noyaux des muscles qu'ils formeront (Michelson 1994 ; Capovilla *et al.*, 2001 ; Enriquez *et al.*, 2010 ; Busser *et al.*, 2013). Lorsque l'on parle de paroi musculaire on se réfère à celle identifiée et caractérisée pour les segments A2-A7. Le segment A9 ne possède pas de paroi musculaire à proprement parlé, alors que les segments T1 et A8 ont une organisation musculaire différente avec peu de muscles plus diversifiés. Les segments T2-T3 et A1 présentent de légères variations, par exemple le segment A1 présente deux muscles de moins que dans les A2-A7 (VO6 et VT1) mais aussi un muscle spécifique, le muscle ventral interne 1 VI1 (Bate, 1990).

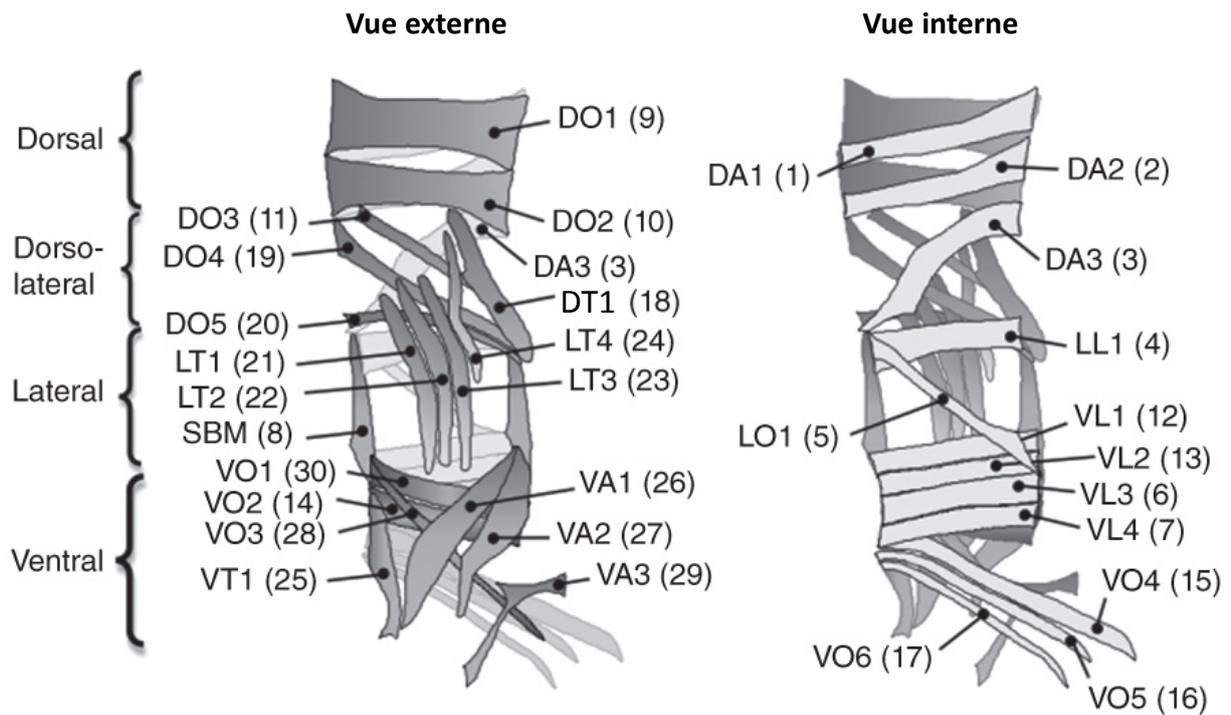


Figure 4: Schéma de la paroi musculaire abdominale

Représentation schématisée d'une vue externe et interne de la paroi musculaire d'un hémisegment embryonnaire. Les deux nomenclatures actuellement utilisées (Crossley et Bate) sont illustrées. Les muscles sont regroupés selon leur position dorsale (DA1, DA2, DO1 et DO2), dorso-latérale (DA3, DO3, DO4, DO5, DT1 et LL1), latérale (LT1-4, LO1 et SBM) et ventrale (VL1-4, VO1-6, VA1-3 et VT1). Adapté de Dobi *et al.*, 2015.

2. Nomenclature de la paroi abdominale :

Ce n'est qu'à la fin des années 70 qu'une analyse détaillée de la structure des fibres musculaires permettra de caractériser en détail une structure complexe composée de fibres musculaires intriquées suivant un pattern bien établi (Crossley, 1978). On dénombre alors 29 muscles par hémisegment abdominal. Afin de les différencier, les muscles sont arbitrairement numérotés en fonction de leur position interne ou externe au sein de la paroi. Cette étude sera finalement complétée en 1993 par M. Bate pour arriver à une nouvelle classification de la paroi musculaire de la drosophile composée cette fois de 30 muscles par hémisegment A2-A7. Ce dernier a notamment pu identifier un nouveau muscle ventral non répertorié par Crossley, le muscle 14.2/14 ou VO2 (Bate, 1990). Dans cette nouvelle description, les fibres musculaires sont soit acutes, obliques, longitudinaux ou transverses en fonction de leur position dans la paroi (à l'exception du muscle de bordure de segment ou SBM). Les muscles sont internes ou externes, et subdivisés en quatre territoires (Bate, 1993 ; Nose *et al.*, 1998). On distingue quatre muscles dorsaux (DA1, DA2, DO1 et DO2), six muscles dorso-latéraux (DA3, DO3, DO4, DO5, DT1 et LL1), six muscles latéraux (LT1-4, LO1 et SBM) et 14 muscles ventraux (VL1-4, VO1-6, VA1-3 et VT1) (Figure 4). A l'heure actuelle, les deux nomenclatures sont encore utilisées.

Cette organisation de fibres musculaires possédant chacune ses propres caractéristiques est un modèle parfait pour étudier l'acquisition d'une identité via l'effet d'un code de facteurs de transcription dits iTFs. En effet chaque fibre est originaire d'une seule cellule dite fondatrice (FC). Ces cellules se distinguent par un code d'iTFs lui-même sous l'influence de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques.

VI. Spécification des précurseurs musculaires :

1. Origine des muscles somatiques :

La découverte des FCs chez la drosophile repose en partie sur deux études de 1983 et 1985 effectuées sur les embryons de criquet (Ho *et al.*, 1983, Ball *et al.*, 1985). Ces travaux précurseurs du laboratoire de C. Goodman ont mis en évidence l'existence de cellules dites pionnières. Ces cellules visuellement identifiables sont les cellules à l'origine de la formation des muscles. Elles sont déjà positionnées à l'emplacement du futur muscle et s'attachent de

part et d'autre à l'épiderme avant le début de la fusion. Chez la drosophile, les premières suggestions de l'existence de précurseurs viennent de l'analyse de l'expression du marqueur β 3-tubuline exprimé dans les muscles embryonnaires (Leiss *et al.*, 1988, Kimble *et al.*, 1989). En effet, l'expression de cet isoforme musculaire ne commence pas au stade de fibres mais est détecté en premier au niveau de cellules individuelles dans le mésoderme somatique. Il est intéressant de noter que cet isoforme β 3, bien que marqueur couramment utilisé encore de nos jours pour révéler les muscles embryonnaires, n'est pas indispensable au processus de myogenèse (Dettman *et al.*, 1996). En 1989, on peut aussi mentionner l'identification de cellules qui envoient des projections cytoplasmiques vers les apodèmes (sites d'attachement) et qui sont alors suggérées comme des candidates potentielles pour constituer les cellules « pionnières » de la drosophile (Johanssen *et al.*, 1989). Mais il faudra attendre 1990 pour que les premiers travaux détaillés sur la formation du muscle embryonnaire montrent l'existence de précurseurs musculaires appelés pour la première fois « cellules fondatrices » à l'origine de chaque fibre (Bate, 1990). On les distingue alors des cellules « pionnières » car elles commencent à fusionner avant de former un patron de fibres musculaires.

2. Identification de marqueurs : vers un modèle de cellules « fondatrices » musculaires :

La même année qui a vu la mise en évidence de précurseurs musculaires, une autre étude a pu établir l'existence de sous-populations de cellules dites « fondatrices » pour certaines fibres musculaires de la paroi musculaire (Dohrmann *et al.*, 1990). Cette observation est corrélée avec la découverte de l'expression restreinte à ces cellules du facteur de transcription à homéoboite S59. Ce dernier n'est pas le premier marqueur identifié puisque les facteurs de transcription à doigt de zinc Krüppel (Kr) (Gaul *et al.*, 1987) et à homéoboite Eve (Frasch *et al.*, 1987) ont déjà été associés à une expression dans des sous-populations de précurseurs musculaires. En parallèle, un autre facteur de transcription bHLH Nautilus a pu être identifié. Il est lui aussi exprimé précocement dans des groupes de cellules correspondant aux précurseurs de muscles (Michelson *et al.*, 1990). Ces nouvelles données vont non seulement dans le sens de l'hypothèse de l'existence de cellules fondatrices pour la formation du muscle, mais aussi vers celle de l'expression par ces cellules de facteurs de transcription permettant de leur conférer cette identité. Au cours des années suivantes, on

découvre l'existence d'un nombre croissant de gènes exprimés de façon spécifique à certains groupes de cellules fondatrices. On retrouve ainsi les facteurs de transcription LIM à homéoboite *Apterous* (*Ap*) (Bourgouin *et al.*, 1992), *Runt* (*Run*)(Drysdale *et al.*, 1993) ou encore l'adaptateur *Vestigial* (*Vg*)(Bate *et al.*, 1993). Malgré l'identification de différents marqueurs des précurseurs musculaires, la validation de l'hypothèse des cellules fondatrices est effectuée en 1995. La découverte du gène *myoblast city* (*mbc*) démontre l'existence de deux sous-populations de myoblastes (Rushton *et al.*,1995). L'une est dite naïve et constitue une réserve de myoblastes (on parle de FCMs) fusionnant avec des cellules fondatrices. Bien que la perte de fonction de *mbc* bloque les mécanismes de fusions, on observe encore la présence de fibres musculaires très fines mononucléées exprimant les marqueurs S59 et *Vg* et possédant un positionnement, une orientation et une innervation corrects. D'une façon similaire aux cellules pionnières du criquet, ces cellules fondatrices possèdent donc bien toute l'information nécessaire à la formation des fibres musculaires. Cette information passe par l'expression de nombreux marqueurs qui forment un code de facteurs de transcription d'identité.

3. Les gènes d'identité musculaire :

Le premier gène identifié comme responsable de l'acquisition d'une identité musculaire est *apterous* (*ap*). En effet, sa perte de fonction entraîne l'absence des fibres qui l'expriment normalement, alors que sa surexpression induit le dédoublement de certaines fibres *ap* positives (Bourgouin *et al.*, 1992). Actuellement, les analyses fonctionnelles ont permis l'identification de nombreux iTFs exprimés ou co-exprimés dans les cellules fondatrices, mettant ainsi en évidence l'existence d'un code d'iTFs. Parmi eux, on distingue : les facteurs de transcription *Ap*, *S59*, *Eve*, *muscle segment homeobox* (*msh*), *Ladybird* (*lb*), *Ptx1*, *Lateral muscles scarcer* (*Lms*), *Tailup/Islet* (*Tup*), *Collier* (*Col*), *Kr*, *Run*, *Poxm*, *Vg*, *Scalloped* (*Sd*), *Optomotor-blind-related- gene-1* (*Org-1*), *Midline* (*Mid*), *Araucan* (*Ara*), *Caupolican* (*Caup*), *Teyrha-Meyhra* (*Tey*), *D-six4*, *Sine oculis* (*So*), *No ocelli* (*Noc*), *Eyes-absent* (*Eya*), *Nau* et *Tw* (Bourgouin *et al.*, 1992 ; Knirr *et al.*, 1999 ; Knirr et Frasch 2001 ; Nose *et al.*, 1998 ; Jagla *et al.*, 1998 ; Vorbrüggen *et al.*, 1997 ; Müller *et al.*, 2010 ; Boukhatmi *et al.*, 2012 ; Crozatier et Vincent 1999 ; Ruiz-Gomez *et al.*, 1997 ; Drysdale *et al.*, 1993 ; Duan *et al.*, 2007 ; MacKay *et al.*, 2003 ; Deng *et al.*, 2008 ; Schaub *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2015 ; Carrasco-Rando *et al.*,

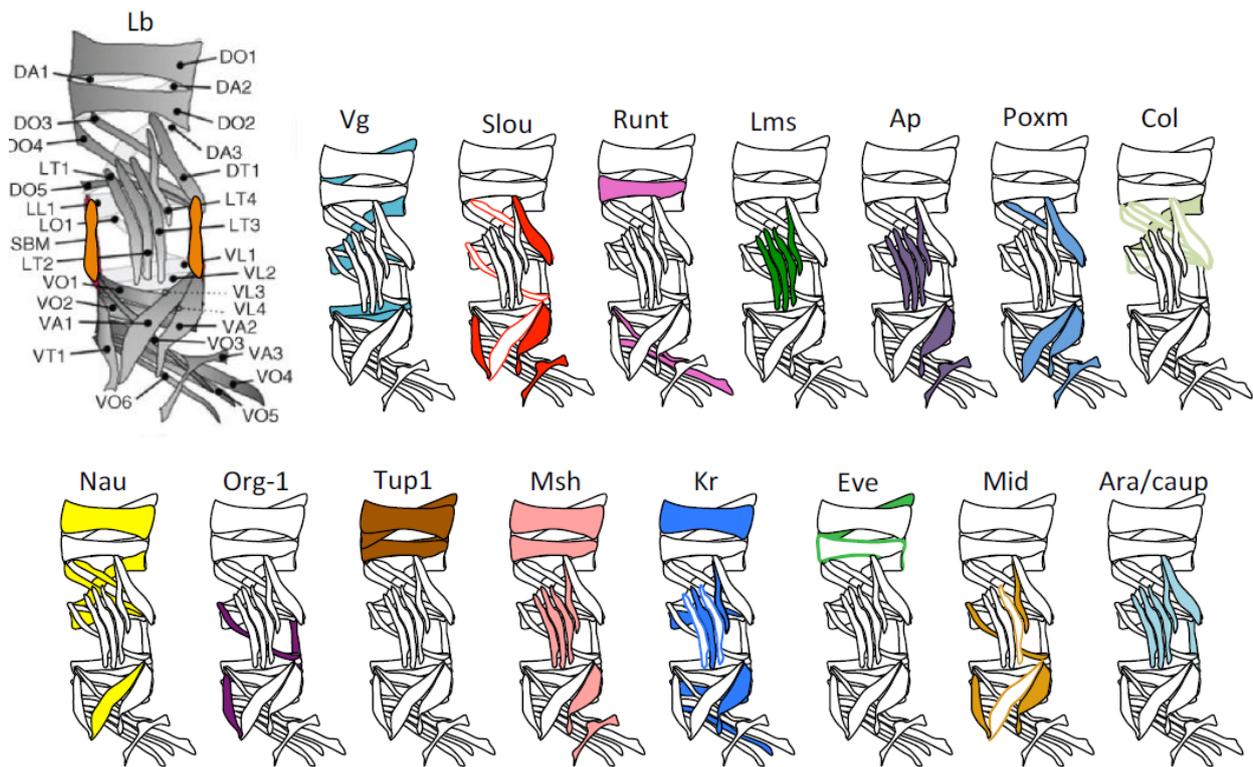


Figure 5: Profil d'expression des iTFs au sein des fibres musculaires

Chaque fibre musculaire exprime un ou plusieurs iTFs permettant l'acquisition d'une identité propre. Les fibres de couleurs pleines correspondent à l'expression continue de l'iTF, contrairement à celles entourées qui ne l'expriment que de façon transitoire. Adapté de la thèse de Benjamin Bertin.

2011 ; Inaki *et al.*, 2010 ; Clark *et al.*, 2006 ; Dubois *et al.*, 2016 ; Keller *et al.*, 1998 ; Wong *et al.*, 2008).

Il est aussi intéressant de noter que dans cette liste exhaustive, on retrouve les deux facteurs de transcription bHLH *Twi* et *Nau*. En effet, l'analyse détaillée de la surexpression et de la diminution de *Twi* a permis l'observation de phénotypes musculaires subtiles affectant uniquement certains muscles de la paroi musculaire (Wong *et al.*, 2008). Ces données, ainsi que la persistance transitoire de *Twi* dans les noyaux de certaines cellules fondatrices, semblent suggérer que *twi* pourrait aussi agir comme un gène d'identité. D'un autre côté, *nau* a pu être identifié grâce à son identité de séquence avec son homologue vertébré *MyoD*. Cependant, *nau* ne semble pas jouer le même rôle que *MyoD* durant la myogenèse. Même si une étude suggère que *nau* est capable d'induire le programme myogénique somatique dans une autre population mésodermale représentée par les cardioblastes (Keller *et al.*, 1997). A la différence de son homologue vertébré, sa perte de fonction n'affecte pas le processus de myogenèse en général mais seulement la formation d'une sous-population de fibres (Keller *et al.*, 1998 ; Balagopalan *et al.*, 2001). Le débat sur le rôle de *nautilus* a récemment pu être relancé par l'observation de son expression précoce avant la détermination des cellules fondatrices (Wei *et al.*, 2007) et plus particulièrement dans le domaine dorso-latéral suggérant un rôle plus large dans le contrôle de la myogenèse (Dubois *et al.*, 2016).

Il est important de noter qu'une expression au stade de cellule fondatrice ne signifie pas forcément que cette expression est maintenue dans la fibre musculaire (Figure 5). On peut prendre comme exemple l'expression transitoire de l'iTF de type COE *collier* dans la sélection des cellules fondatrices des muscles dorso-latéraux mais qui ne reste exprimé que dans le muscle DA3 (Dubois *et al.*, 2007). De plus, un même iTF peut être spécifique d'une sous-population musculaire comme l'iTF à homéodomaine *ladybird* dans le muscle SBM (Jagla *et al.*, 1998) ou bien être exprimé dans plusieurs fibres, soit dans une même région comme l'iTF LIM à homéodomaine *tailup/islet* dans les muscles dorsaux (Boukhatmi *et al.*, 2012), soit dans plusieurs domaines comme *S59* exprimé dans 7 FCs à différentes positions dorso-latérales (DO3, DT1), latérale (LO1) et ventrales (VA1-3, VT1). Son expression n'est en revanche pas maintenue dans tous les muscles correspondants, seuls les muscles VA2, VT1 et DO1 conservent *S59*.

4. Combinatoire d'expression des facteurs de transcription d'identité :

Ces iTFs possèdent des profils d'expressions spatiaux et temporels complexes, parfois chevauchants. Cette observation remonte aux premiers iTFs identifiés, *ap* et *S59*, qui possèdent une expression commune dans le muscle VA2 (Bourgouin *et al.*, 1992). Au fur et à mesure que d'autres iTFs sont découverts, on voit alors émerger progressivement l'existence d'un réseau d'iTFs. Par exemple, la FC à l'origine du muscle le plus dorsal DA1 exprime *nan* de façon transitoire et co-exprime les iTFs *Kr*, *tup* et *eve* (Boukhatmi *et al.*, 2012 ; Ruiz-Gomez *et al.*, 1997 ; Frasch *et al.*, 1987). Les pertes de fonction de ces gènes entraînent une transformation du DA1 en muscle transverse ou oblique pour *Kr*, une absence de DA1 avec un élargissement du DA2 dans le cas d'un mutant mésodermal de *eve* (Fujioka *et al.*, 2005)(cependant seuls des défauts partiellement pénétrants sont observés dans le cas d'un mutant thermosensible de *eve* (Landgraff *et al.*, 1999)), et une absence de défauts pour *tup*. De plus, la perte de fonction de *Kr* ou *eve* entraîne une absence d'expression de l'autre. Ces données illustrent non seulement la co-expression et l'effet propre de chaque iTF, mais aussi la co-dépendance de certains iTFs. On sait aujourd'hui que ces iTFs peuvent interagir entre eux de différentes façons. i) En activant de nouveaux iTFs comme *org-1* qui induit l'expression de *lb* et *S59* (Schaub *et al.*, 2012), démontrant l'existence d'une hiérarchie entre certains iTFs. ii) En réprimant d'autres iTFs avec notamment l'inhibition croisée de *lb* et *S59* (Knirr *et al.*, 1999). En effet, l'expression de *S59* dans la FC du LO1 permet la répression de *lb*. Dans le cas d'une perte de fonction de *S59*, l'expression de *lb* dans cette cellule n'est pas éteinte et aboutit à la formation d'un deuxième muscle SBM et une absence de LO1. Par la suite il a pu être démontré que *lb* possède aussi la capacité de réprimer *S59* (Junion *et al.*, 2007) mais aussi *msh* et *eve* (Jagla *et al.*, 2002). iii) En coopérant avec d'autres iTFs comme les facteurs de transcription à homéoboite *lms* et *ap* nécessaires à la formation des muscles latéraux transverses LT1-4 (Müller *et al.*, 2010). Les mutations nulles de *ap* ou de *lms* possèdent un phénotype d'altération morphologique et parfois de perte de muscles LTs mais ces défauts sont peu pénétrants. Cependant, les doubles mutants présentent une aggravation de ces phénotypes, suggérant une coopération entre ces deux iTFs dans l'acquisition de l'identité des muscles LTs.

Ainsi, ces interactions multiples permettent le raffinement de l'expression de ces iTFs aboutissant *in fine* à une identité propre à chaque fibre musculaire. Des études se sont

intéressées à la compréhension des mécanismes permettant la régulation de l'identité musculaire afin d'identifier le rôle précis des iTFs qui reste encore peu détaillé. On peut citer l'isolation et le séquençage de FCs exprimant les iTFs *ap* ou *S59* qui ont mis en évidence le rôle du régulateur de la chromatine *sin3a* dans la spécification des muscles *S59* positifs VA1 et VA2 (Dobi *et al.*, 2014), l'étude des sites de fixation des iTFs *msh* et *S59* (Busser *et al.*, 2012) ou encore l'analyse des cibles par CHIP du iTF *lb* (Junion *et al.*, 2007). Cette dernière a permis l'identification de nombreuses cibles directes impliquées dans les différents processus de la formation de la fibre telles que la fusion, la migration ou encore la contraction musculaire. A la suite de cette étude, trois gènes cibles de *lb* ayant une expression différentielle dans la majorité des fibres musculaires ont été analysés en détail pour leur rôle dans la fusion et leurs interactions avec les iTFs. Ce travail a permis de mettre en avant que les iTFs *eve*, *lb* et *S59* permettent la modulation de l'expression des gènes *Muscle protein 20* (*Mp20*), *Paxillin* (*Pax*), et *m-spondin* (*mspo*). Ces variations d'expression sont impliquées dans la régulation des événements de fusion d'une façon muscle-spécifique et dépendante de la quantité de protéines disponibles (Bataillé *et al.*, 2010). Il a aussi pu être démontré que certains iTFs régulent l'expression spécifique de certaines protéines nécessaires à l'innervation correcte des muscles. On peut citer *Kr* qui interagit génétiquement avec les membres de la famille des CAMs *fasciclin 2* et *capricious* impliqués dans la guidance des axones (Abrell et Jäckle, 2001). Mais la première démonstration qu'un iTF contrôle directement l'innervation vient de l'analyse du facteur de transcription *Teyrha-Meyhra* (*tey*) (Inaki *et al.*, 2010). *Tey* est exprimé dans le VL1 et permet la répression spécifique du récepteur à répétitions riches en Leucine (LRR) Toll qui est exprimé dans le VL2. Le rôle de répulsion de certains axones par Toll permet l'innervation spécifique des muscles VL1 et VL2. Il est désormais admis que le contrôle de l'identité passe notamment par le contrôle de l'expression de nombreuses protéines sous l'action des iTFs en plus de facteurs myogéniques généraux tel que *twi* et *mef2*. Cependant, de nombreux mécanismes d'acquisition d'identité musculaire restent à élucider afin de comprendre comment ces iTFs agissent.

Encore aujourd'hui, de nouveaux iTFs sont découverts (Dubois *et al.*, 2016 ; Kumar *et al.*, 2015) et cette diversité d'iTFs, associée à la combinaison d'interactions entre ces mêmes facteurs, soulèvent aussi la question de l'acquisition d'un tel code. L'étude détaillée des

profils d'expressions des iTFs a permis de mettre en évidence que les FCs proviennent de la division de cellules appelées progéniteurs ou PCs eux même sélectionnés à partir de groupes plus larges de cellules appelées groupes d'équivalence. La découverte du lignage et du processus de ségrégation des FCs provient des premières expériences sur l'impact des gènes dits neurogéniques sur le développement du mésoderme.

5. Influence des gènes neurogéniques :

Il ne s'agit pas ici de l'ensemble des gènes impliqués dans la neurogenèse mais d'un groupe de gènes appelés neurogéniques qui ont été caractérisés pour leur rôle dans la différenciation des dérivés de l'ectoderme tout au long de l'embryogenèse (Lehmann *et al.*, 1983). Le premier gène identifié par ce phénotype dit neurogénique est *Notch (N)* en 1937 par Poulson, les autres gènes neurogéniques sont tous impliqués dans la régulation de la voie N. Parmi ces gènes, on retrouve *Notch (N)*, *neuralized (neur)*, *almondex (amx)*, *Delta (DI)*, *bigbrain (bib)*, *Suppressor of Hairless (Su(H))* et *Enhancer of split (E(spl))*. Au cours des années 90, ces gènes ont aussi été impliqués dans le développement du mésoderme (Corbin *et al.*, 1991). Cette étude montre que les mutations nulles des différents gènes neurogéniques conduisent à une augmentation de la quantité de précurseurs musculaires exprimant l'iTF *nau* ainsi qu'une absence de formation de paroi musculaire malgré l'expression de gènes de différenciation comme MHC. Ce travail sera approfondi en 1993, en démontrant que ces mêmes mutations nulles augmentent aussi le nombre de cellules *S59* et *vestigial* positives (Bate *et al.*, 1993). La voie N semble donc nécessaire pour la ségrégation des FCs d'une façon autonome au mésoderme (Baker et Schubiger, 1996). Dans le même sens, la surexpression d'une forme constitutivement activée de N bloque la formation des FCs (Ruiz-Gomez et Bate 1997 ; Landgraff *et al.*, 1999). En résumé, la persistance de groupes de cellules exprimant les iTFs spécifiques des FCs dans les mutants de la voie N suggère que les FCs seraient issues d'une sélection N-dépendante à partir de groupes de cellules.

6. Détermination des groupes d'équivalence :

Suite à la découverte de l'effet des gènes neurogéniques, le travail de A. Carmena a permis la mise en évidence de groupes transitoires de cellules précédant la sélection des FCs au sein du mésoderme somatique (Carmena *et al.*, 1995) (Figure 6). Ces groupes sont caractérisés

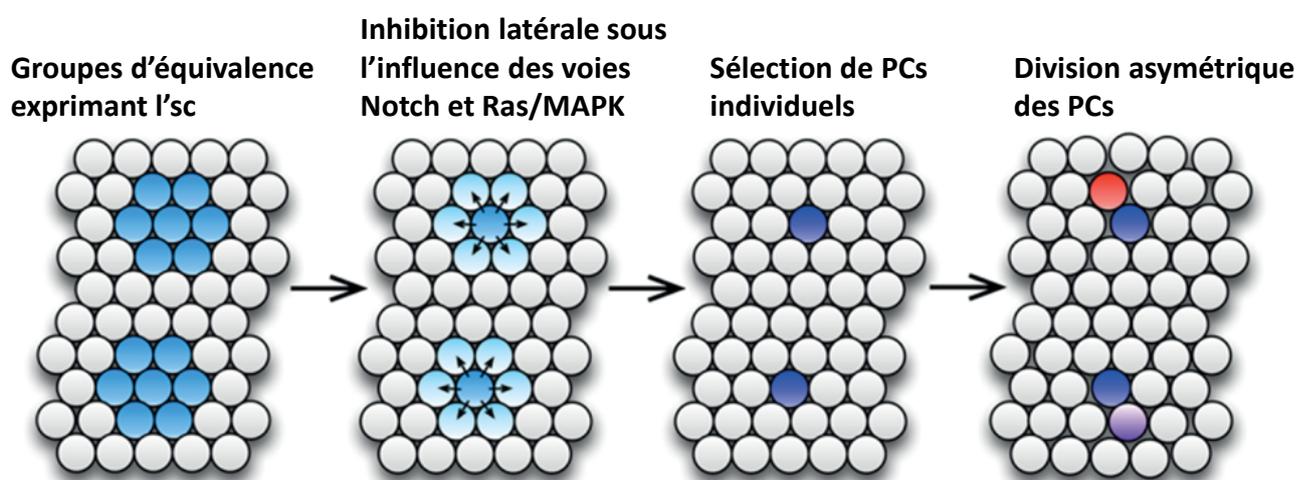


Figure 6: Détermination du destin myogénique à partir de groupes d'équivalence

Au sein du mésoderme somatique, des groupes dits d'équivalence sont marqués par l'expression du gène pro-neural *lethal of scute (l'sc)*. Chaque groupe donnera naissance à un ou plusieurs progéniteurs (PCs) sous l'action des voies Notch et Ras/MAPK, les cellules non sélectionnées deviennent des myoblastes compétents pour la fusion. Ces progéniteurs subissent ensuite une division asymétrique aboutissant soit à la formation de deux cellules fondatrices (FCs) (cellules bleue et violette), soit d'une FC et d'un précurseur cardiaque ou d'un Précurseur de Muscle Adulte (AMP) (représentés en rouge). Adapté de Dobi *et al.*, 2015.

par l'expression du gène pro-neural *lethal of scute (l'sc)*, membre du complexe *achaete-scute*. Dans chaque para-segment on distingue au moins 19 groupes distincts au sein du mésoderme, avec le groupe 19 spécifique aux segments thoraciques. L'analyse détaillée de l'expression de S59 montre que chaque cellule du groupe S59 positif commence par exprimer les gènes d'identité, on parle alors de groupes d'équivalence (GEs). Ensuite, l'expression est restreinte à une seule cellule qui est alors appelée progéniteurs (PCs). Cette étape est notamment sous le contrôle de la voie N par le biais de l'inhibition latérale. Les PCs subissent une dernière étape de division qui aboutit à la formation de deux cellules FCs. Le processus de sélection des PCs est finement régulé. Il est asynchrone c'est-à-dire que tous les PCs ne sont pas sélectionnés en même temps (Buff *et al.*, 1998; Halfon *et al.*, 2000). D'un point de vue spatial, les PCs et leurs cellules filles ne sont pas toujours formées à la future position occupée par les fibres musculaires qu'ils formeront (Nose *et al.*, 1998, Beckett et Baylies, 2007). De plus, les processus de sélection d'un GE semblent plus complexes que la simple expression de *l'sc*, en effet un même groupe peut former plusieurs PCs d'une manière séquentielle comme pour les muscles dorso-latéraux (Crozatier et Vincent, 1999 ; Dubois *et al.*, 2007).

Désormais, le rôle clé de *l'sc* est de plus en plus remis en question (Duan *et al.*, 2007 ; Dubois *et al.*, 2016). Ce débat est justifié par l'absence de phénotype musculaire drastique en cas de mutation nulle de *l'sc* qui, de plus, est sauvé en partie par une expression pan-mésodermale de *l'sc* suggérant que son expression restreinte dans des groupes d'équivalence n'est pas indispensable (Carmena *et al.*, 1995). En effet, il est difficile d'imaginer que *l'sc* soit le seul gène à permettre la sélection des progéniteurs musculaires. Les nouvelles données sur l'expression précoce des deux gènes *poxm* et *nau* connus pour leur rôle d'iTF suggèrent qu'ils puissent être impliqués dans le processus de sélection de ces groupes d'équivalence. Certains proposent aussi le gène *twi* comme candidat pour la mise en place de ces groupes d'équivalence. Il ne s'agit encore que d'hypothèses et l'ensemble des mécanismes permettant cette sélection de PCs restent encore à élucider. Néanmoins, il a pu être démontré que cette sélection repose aussi sur de nombreux signaux intrinsèques et extrinsèques provenant notamment de l'ectoderme.

7. Rôle des voies N, EGF, FGF, Wg et Dpp :

Bien qu'incomplet, le modèle de sélection des GE a été raffiné en 1998 en ajoutant la notion de domaines de compétence en prenant comme modèle les GE dorsaux 2 et 15 identifiés grâce à l'expression de *eve* spécifique à ces deux GE (Carmena *et al.*, 1998). Ces GE donneront les PCs 2 et 15 qui formeront respectivement les FCs du DO2 et DA1. La formation de ces deux GE est précédée par la mise en place d'un domaine plus large exprimant *l'sc*. Ce domaine de compétence est lui-même sous le contrôle croisé des voies Dpp et Wg. Au sein de ce domaine, on observe ensuite un raffinement de l'expression de *l'sc* en GE cette fois-ci sous le contrôle des voies Ras-MAPK, EGF et FGF. En effet, l'activation des voies Wg et Dpp permet le maintien de *tin* et *twi* qui vont à leur tour moduler l'expression des récepteurs EGFR et Htl au sein du domaine de compétence (Halfon *et al.*, 2000). Au niveau du mésoderme, la voie EGF est spécifique de l'action du ligand Spitz (Spi) (Rutledge *et al.*, 1992 ; Buff *et al.*, 1998) et celle du ligand neuregulin-like Vein n'a pas d'effet sur la sélection des PCs (Schnepf *et al.*, 1996 ; Yarnitzky *et al.*, 1997). Environ la moitié des muscles sont dépendants de la signalisation EGFR. Par exemple, l'utilisation de mutants pour *spitz* ou la surexpression d'une forme dominante négative de EGFR affectent la sélection du PC 15 mais pas celle du PC 2 (Buff *et al.*, 1998). En parallèle, la voie FGF est elle aussi impliquée dans la sélection des PCs (Michelson *et al.*, 1998). Par exemple, le PC 15 repose non seulement sur l'activation de la voie EGF mais aussi de la voie FGF illustrant une coopération de ces deux voies. L'activation de la voie FGF passe par le récepteur Htl via les ligands Thisbe et Pyramus (Stathopoulos *et al.*, 2004) dont les rôles sont partiellement chevauchant dans la sélection des PCs (Klingseisen *et al.*, 2009). La capacité de pouvoir sélectionner un seul PC à partir d'un GE repose principalement sur l'équilibre et les interactions entre les voies N et Ras-MAPK (Carmena *et al.*, 2002). Ces deux voies sont indispensables, le processus de sélection repose sur l'activation dans le GE de la voie Ras-MAPK jusqu'à atteindre un seuil dans le futur PC. Une fois ce seuil atteint, la voie Ras-MAPK va alors activer l'expression du ligand de la voie N *Delta* et de l'antagoniste du récepteur EGFR *argos* permettant de bloquer la voie Ras-MAPK dans les cellules non-progéniteurs. Les autres cellules non progéniteurs du GE vont alors continuer d'exprimer N et inhiber progressivement la voie Ras-MAPK qui va à son tour bloquer l'expression de *Delta* et *argos*. Une fois le PC sélectionné la voie Ras-MAPK diminue progressivement dans ce dernier avec la diminution de l'expression de son ligand

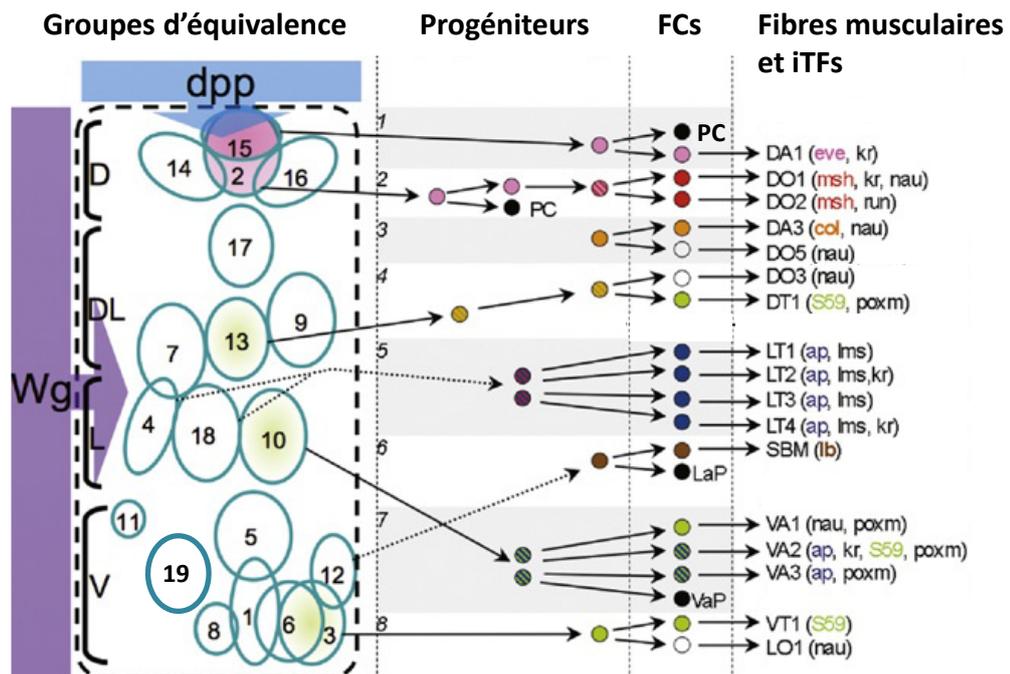


Figure 7: Spécification des cellules fondatrices (FCs)

Les FCs, à l'origine des fibres musculaires embryonnaires, sont spécifiées à partir de la division asymétrique de progéniteurs, eux-mêmes sélectionnés au sein de différents groupes d'équivalence présents dans le mésoderme somatique. Les divisions de ces progéniteurs aboutissent à la formation de 2 précurseurs cardiaques (PCs), 6 AMPs (ici seules les AMPs latérales et ventrales sont représentées LaP, VaP) et 30 FCs possédant chacune un code de facteurs de transcription d'identité (iTFs). Adapté de de Jossineau *et al.*, 2012.

spi. Elle reste cependant impliquée dans l'acquisition de l'identité des FCs en agissant sur certains iTFs. On sait que la voie Ras-MAPK est nécessaire pour l'induction de l'expression de *eve* (Halfon *et al.*, 2000). De plus, l'inhibition de *S59* par l'iTF du complexe iroquois *Caupolican* est dépendante de la voie EGF dans certaines FCs (Carrasco-Rando *et al.*, 2011). D'une façon similaire, la voie N est aussi impliquée dans l'identité des FCs. L'identité des FCs du DA3 et du DO5, issues du même progéniteur, dépend de l'activation asymétrique de la voie N dans la FC du DO5 qui va inhiber l'expression de *col* (Crozatier et Vincent, 1999). Cette distinction entre ces deux FCs repose sur la division asymétrique du PC.

8. Régulation des divisions des progéniteurs :

Ainsi, un PC se divise de manière asymétrique aboutissant à la formation de deux cellules filles aux destins différents qui formeront une fibre musculaire possédant une identité propre (Figure 7). En plus de la formation des FCs, les divisions de certains PCs vont donner naissance à une FC et un autre type cellulaire. On distingue ainsi des précurseurs des cellules péricardiques, des cardioblastes, et les Précurseurs de Muscles Adultes (AMPs). Par exemple, les cellules sœurs formées par la division du PC 2 sont la FC du DO2 et un précurseur de cellules péricardiques, et le PC 15 donne naissance à la FC du DA1 et à un précurseur d'une sous-population de cardioblastes (Speicher *et al.*, 2008). Certains des acteurs impliqués dans la division asymétrique des PCs ont pu être identifiés. Historiquement, le premier à avoir été découvert est le gène *numb* (Uemura *et al.*, 1989). Bien que sa mutation entraîne un phénotype musculaire avec des pertes et duplications de certains muscles, l'absence de connaissances sur l'expression et les fonctions de *numb* a conduit à l'hypothèse que son action serait dépendante du système nerveux. En 1997 il a pu être montré que *numb* est exprimé par les PCs (Ruiz Gómez et Bate, 1997). Le gène *numb* joue un rôle important au cours du processus de division asymétrique. Il code pour une protéine associée à la membrane et se localise en croissant cortical au pôle basal de la cellule en cours de division. Dans le système nerveux, il est requis pour l'acquisition du destin des cellules filles par son action inhibitrice de N (Guo *et al.*, 1996 ; Spana et Doe 1996). La répartition asymétrique de *numb* est sous le contrôle de la protéine Inscutable (*Insc*) impliquée dans la division asymétrique (Kraut *et al.*, 1996). En effet, la mutation de *insc* affecte aussi la localisation de *numb* qui n'est plus hérité de façon asymétrique (Ruiz Gómez et Bate, 1997). Le gène *insc* a

été pour la première fois associé à la formation de la paroi musculaire grâce à l'étude d'un mutant appelé « not enough muscles » (Burchard *et al.*, 1995), ce dernier porte en effet une mutation nulle qui affecte le gène *insc* (Knirr *et al.*, 1997). Les PCs expriment aussi *Insc* qui forme un croissant cortical au pôle apical à l'opposé de *numb* (Kraut et Campos-Ortega 1996 ; Ruiz Gómez et Bate, 1997 ; Carmena *et al.*, 1998). Cependant, l'ensemble des muscles de la paroi ne sont pas affectés dans le cas des pertes de fonction de *numb* et *insc*. Ceci suggère que d'autres acteurs sont impliqués dans ce processus de division asymétrique. En effet, de nouveaux acteurs ont été identifiés au cours de ces dernières années impliquant une régulation complexe des mécanismes de division des PCs. On peut citer la protéine à domaine PDZ canoe (Speicher *et al.*, 2008) qui agit avec *Insc* dans l'orientation du fuseau mitotique et la sublocalisation de déterminants du destin cellulaire. Plus récemment, il a aussi été démontré que les kinases associées à la voie Hippo ont une action régulatrice sur la division asymétrique qui est associée à canoe et indépendante de la voie Hippo (Keder *et al.*, 2015). Parmi ces kinases, Warts et son co-facteur Mats ont directement été impliqués dans la division asymétrique des PCs 2 et 15.

En résumé, nous avons pu voir que la détermination des FCs passe par la formation de domaines de compétence sous l'action des voies *dpp* et *wg*. Ces derniers ont une expression de l'*sc* progressivement restreinte par la voie Ras-MAPK jusqu'à former des groupes d'équivalence. Au sein de ces groupes d'équivalence vont émerger les PCs sous le contrôle des voies Ras-MAPK et N qui donneront les FCs par division asymétrique. En parallèle, les cellules qui ne deviennent pas des PCs conservent un destin myogénique et forment une population de myoblastes dits compétents à la fusion (FCMs).

9. Les myoblastes compétents à la fusion :

Il est important de noter que l'étude du mutant du gène *myoblast city* a non seulement permis de valider l'hypothèse de l'existence de cellules fondatrices, mais a aussi permis de démontrer l'existence des FCMs. Les FCMs expriment notamment le facteur de transcription à doigt de zinc lame duck (*lmd*) membre de la superfamille Gli (Duan *et al.*, 2001). L'expression de *lmd* est nécessaire pour l'acquisition du programme des FCMs, de son expression dépend celle de nombreux gènes tels que *hairy* (Ruiz-Gomez *et al.*, 2002), *goliath* (Cunha *et al.*, 2010), *mef2*, ou encore *stick and stones (sns)* qui code pour une protéine de la

famille des Immunoglobulines (IGs) nécessaire pour la fusion des FCMs (Duan *et al.*, 2001 ; Bour *et al.*, 2000). En parallèle, l'expression dans les FCMs du répresseur tramtrack69 (Ciglar *et al.*, 2014) va permettre de réprimer certains gènes des FCs. Même si les FCMs apparaissent comme une population homogène de myoblastes « naïfs », en 2001 il a été démontré l'expression transitoire dans les FCMs d'une autre protéine de la famille des IGs, Hibris, au cours des premières étapes de la fusion entre FCs et FCMs (Artero *et al.*, 2001). Cette étude a été la première à suggérer qu'il existerait aussi des sous-populations de FCMs. L'analyse spatiale des FCs et des FCMs au sein du mésoderme a aussi montré que certains FCMs s'engagent dans une nouvelle vague de division (Beckett et Baylies 2007). Ces observations sont intéressantes et conduisent à se demander si les FCMs ne possèdent pas aussi une identité puisqu'ils dérivent de différents GEs et ont exprimé de façon transitoire des iTFs spécifiques aux FCs. Cependant, il a pu être démontré que les FCMs ne possèdent pas de mécanismes d'identité similaire, aux FCs car des FCMs de différents GEs contribuent indifféremment à la fusion avec une cellule fondatrice donnée (Bataillé *et al.*, 2017). De plus, cette distinction FCM et FC semble, dans une certaine mesure, disparaître après la fusion. Suite à la fusion, les noyaux des FCMs sont progressivement reprogrammés en commençant par la dégradation de *lmd* par l'ubiquitine ligase E3 *mind bomb 2* exprimée spécifiquement dans les FCs (Carrasco-Rando et Ruiz-Gomez, 2008). Suite à la perte de *lmd*, les noyaux des FCMs commencent à exprimer les gènes d'identité correspondant à la FC à l'origine de la fibre (Dohrmann *et al.*, 1990) ainsi que les différents gènes de réalisation nécessaires à la formation d'une fibre fonctionnelle. Il est cependant surprenant d'observer que cette conversion n'est pas complète dans certaines fibres et que certains gènes restent exprimés majoritairement dans le noyau correspondant à la FC. Ainsi, le gène *connectin (con)* qui code pour une protéine d'adhésion homophile à répétitions riches en Leucine (LRR), ne reste exprimé que dans le noyau de la FC du DA3 à l'inverse du DT1 où tous les noyaux l'expriment (Bataillé *et al.*, 2017). Cette observation est intéressante car elle confirme ce qui avait été observé en 1998 avec l'expression dans un seul noyau du muscle VL1 du gène *capricious* codant pour une protéine de la famille des LRR impliquée dans l'innervation des fibres musculaires (Shishido *et al.*, 1998).

VII. Formation des fibres musculaires :

1. La fusion des myoblastes :

La formation des fibres musculaires commence au stade 12 au cours la rétractation de la bandelette germinative (Bate, 1990). L'ensemble des mécanismes de fusion s'étendent sur 5 à 6 heures et permettent la formation de fibres musculaires contenant de 3 à 25 noyaux. Visuellement, cette étape de fusion commence par l'apparition de « doublets » et « triplets » de cellules dans le mésoderme somatique de façon asynchrone en commençant par le domaine ventral. Suite à cette étape initiale, d'autres événements de fusion vont avoir lieu jusqu'au stade 15, et ce, jusqu'à aboutir à des fibres musculaires possédant le nombre de noyaux prédéterminé. Il est intéressant de préciser que la fusion des FCs/FCMs a tout d'abord été décrite comme un modèle en deux étapes suite à l'analyse de mutants nuls pour deux gènes impliqués dans la fusion *kette* et *blownfuse* (Schroter *et al.*, 2004). La première étape aboutirait à la formation de doublets/triplets, puis une phase de fusion secondaire. Cependant une nouvelle analyse de ces mutants a pu montrer qu'il n'existe pas réellement une telle distinction (Beckett et Baylies, 2007). Un nouveau modèle a été établi et repose sur deux vagues temporelles distinctes. Une première vague lente entre les stades 12 et 13 comprenant environ 9-27% des événements de fusion, et une seconde vague plus rapide qui s'étend du stade 14 à la fin du stade 15 avec les 73–91% d'événements restants. Les mécanismes régissant la transition entre ces deux phases ne sont pas encore bien compris. Parmi les acteurs potentiels de cette transition, on peut citer le rôle de la glycolyse dont l'activité est augmentée dans la fibre en cours de fusion (Tixier *et al.*, 2013). De même, au niveau des FCMs la diminution de la protéine Hibris (Hbs) correspond au stade d'initiation de la phase rapide (Artero *et al.*, 2001). Il a pu être montré que les deux protéines d'adhérence exprimées par les FCMs Sns et Hbs ont une fonction redondante, mais Hbs est moins efficace que Sns, pouvant ainsi ralentir le processus de fusion (Shelton *et al.*, 2009).

Brièvement, la fusion entre FC et FCM est initiée par l'expression asymétrique de protéines transmembranaires de la famille des IGs (Figure 8A). Les FCs expriment à leur surface les protéines Dumbfounded/Kin-of-IrreC (Duf) et Roughest/Irregular-optic-chiasm-C (Rst) dont les fonctions sont redondantes (Ruiz-Gomez *et al.*, 2000 ; Strunkelberg *et al.*, 2001). Ces protéines sont reconnues par Hibris (hbs) et principalement Stick and stones (Sns) exprimées

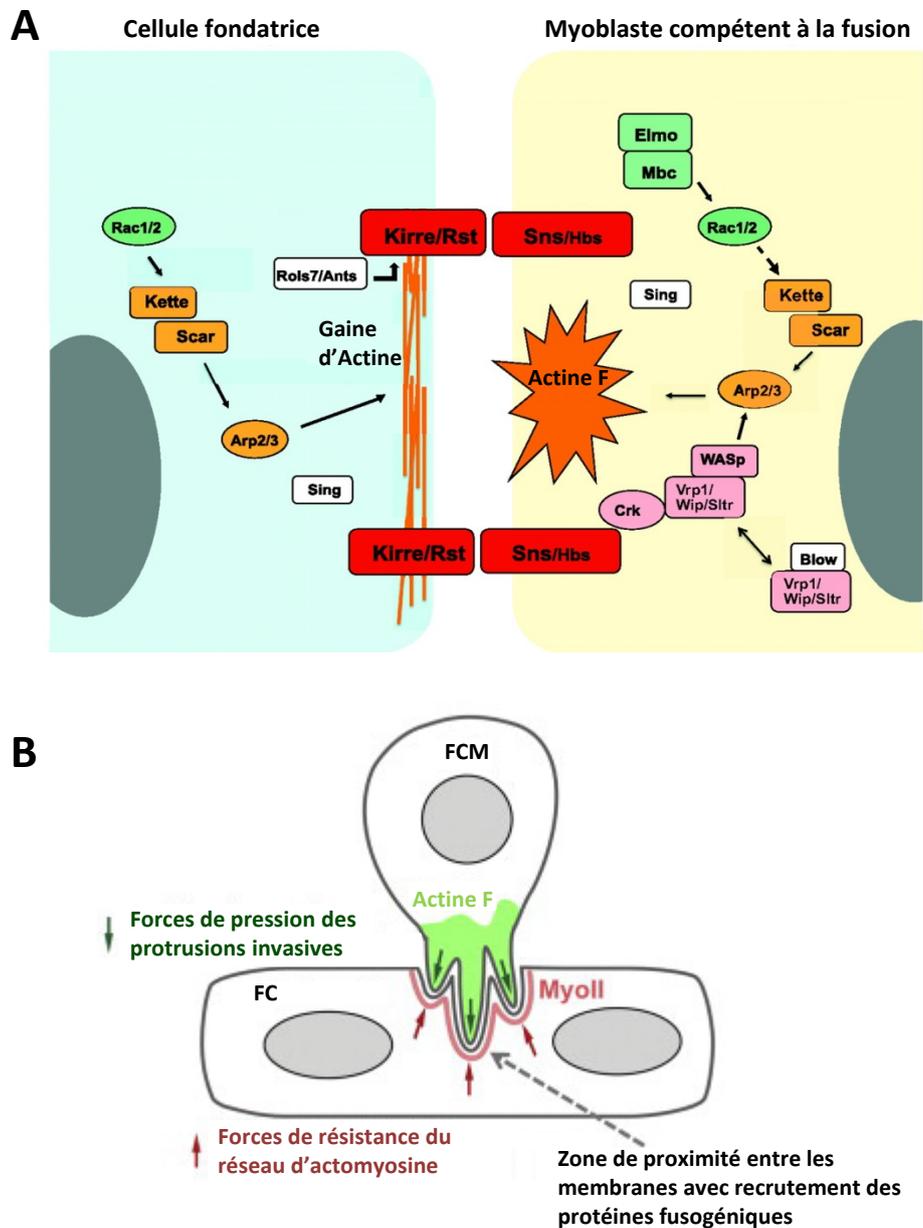


Figure 8: Mécanismes et acteurs impliqués dans la fusion des myoblastes

A. Schéma des protéines permettant la reconnaissance et l'adhésion des cellules fondatrices (FCs) et des myoblastes compétents à la fusion (FCMs). Les acteurs impliqués dans la dynamique de l'actine au cours de la fusion sont aussi représentés. **B.** Description des acteurs principaux responsables de la création d'une zone de forte tension nécessaire à la fusion des FCMs avec les FCs. Adapté de Kim *et al.*, 2015 et Abmayr et Pavlath, 2012.

par les FCMs (Bour *et al.*, 2000 ; Artero *et al.*, 2001 ; Dworak *et al.*, 2001). En effet la surexpression ectopique des protéines Duf et Rst permet à elle seule l'attraction des FCMs via Sns (Ruiz-Gomez *et al.*, 2000 ; Strunkelberg *et al.*, 2001 ; Galetta *et al.*, 2004). Cette attraction passe par une étape de migration des FCMs vers les FCs via des extensions membranaires caractérisées par l'adoption d'une forme caractéristique en « larme » des FCMs (Doberstein *et al.*, 1997 ; Richardson *et al.*, 2008). Après reconnaissance et adhésion des FCs/FCMs via les complexes Sns-Hbs/Duf-Rhs une synapse fusogénique (SF) se forme à l'interface entre les deux cellules. Ces molécules d'adhésion vont alors pouvoir activer de nombreux partenaires aboutissant au remodelage du cytosquelette d'actine via la régulation du polymérisateur d'actine Arp 2/3 (Figure 8A). On observe au niveau de la SF l'apparition de foci d'actine F (Kesper *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2007 ; Richardson *et al.*, 2007). Une étude plus détaillée a permis par la suite d'identifier que ces foci d'actine ne sont pas présents dans les deux types cellulaires (Sens *et al.*, 2010). En effet, on observe cet enrichissement d'actine uniquement dans le FCM qui va alors former des protrusions invasives de type podosome. Du côté de la membrane de la FC, on observe la formation d'une fine gaine d'actine au niveau de la SF. En parallèle, les complexes SCAR (Richardson *et al.*, 2007) et WASp (Schäfer *et al.*, 2007), considérés comme les deux principaux régulateurs d'Arp2/3, sont aussi répartis asymétriquement au niveau de la SF. SCAR est ainsi exprimé dans les deux types cellulaires (Gildor *et al.*, 2009) alors que WASp est retrouvé spécifiquement au niveau des FCMs (Sens *et al.*, 2010). Cependant, l'absence de WASp ou d'une protéine associée à WASp, Verprolin1 (Massarwa *et al.*, 2007), a montré que le complexe WASp n'est pas indispensable pour la formation de foci d'actine (Gildor *et al.*, 2009) suggérant une redondance entre les différents régulateurs de l'actine. Néanmoins, le complexe WASp est requis pour la stabilité des podosomes invasifs des FCMs (Sens *et al.*, 2010).

Ainsi, la fusion des FCMs/FCs consiste en la formation d'une synapse fusogénique sous l'action des protéines transmembranaires de reconnaissance. Ces dernières sont maintenues au niveau de la SF par un réseau de protéines structurales lié à la membrane et constitué de dimères α/β_H spectrine qui promeut leur recrutement et qui empêche leur diffusion au niveau de la membrane de la FC (Duan *et al.*, 2018). Ce réseau permet aussi de contenir les structures invasives des FCMs augmentant ainsi les tensions mécaniques au niveau de la SF. Initialement, cette tension est aussi responsable de l'activation mécano-sensible de la

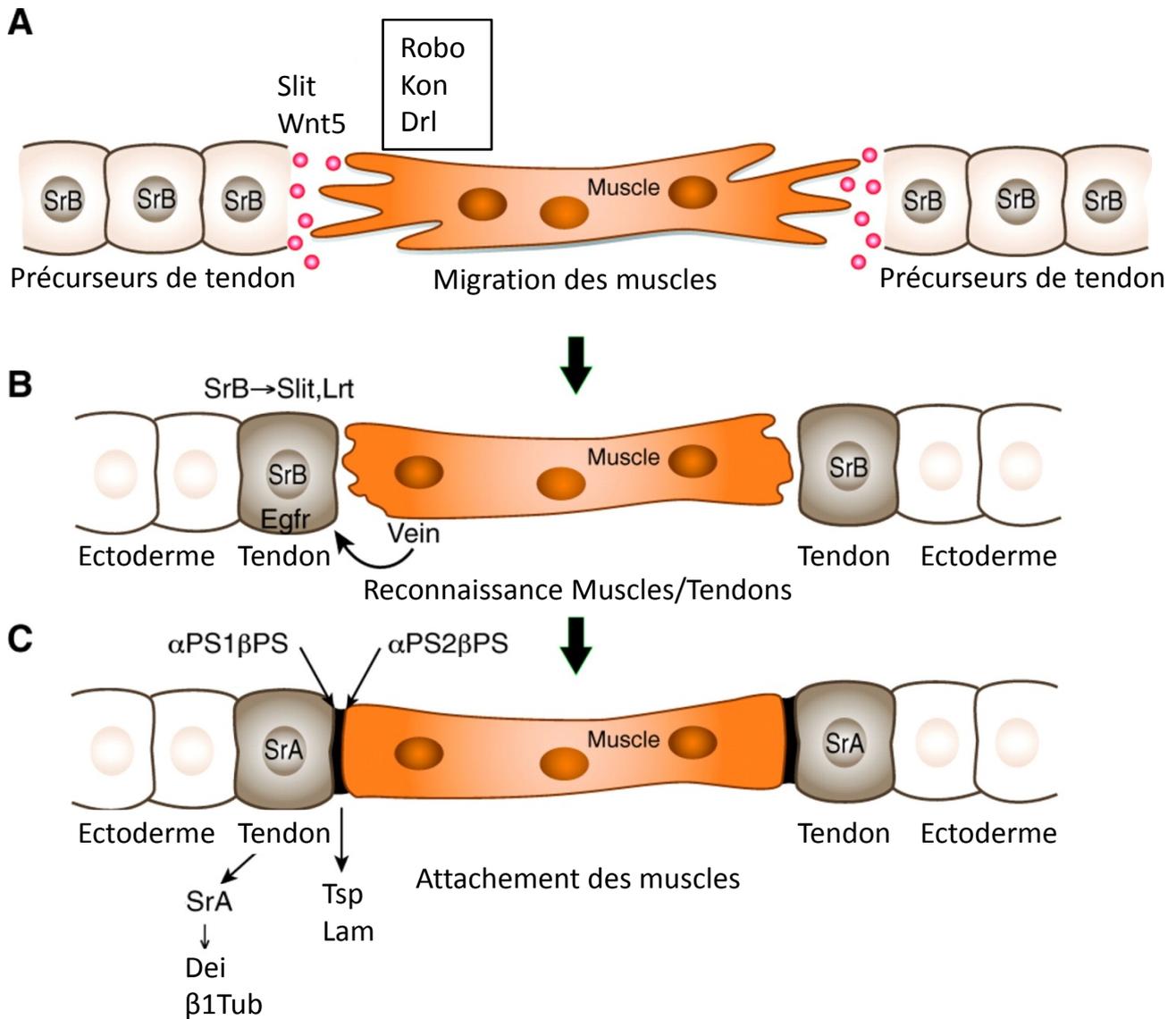


Figure 9: Mise en place de la jonction myotendineuse

L'attachement des fibres musculaires se déroule en plusieurs étapes. Les fibres musculaires migrent vers les futurs sites d'attachement constitués de plusieurs précurseurs de tendon sécrétant les protéines d'attraction Slit ou Wnt5 (A). Sous l'influence du ligand de la voie EGF, Vein, sécrété par les fibres, un précurseur est spécifié en cellule tendon qui deviendra le futur point d'ancrage de la fibre (B). La jonction myotendineuse est finalement stabilisée par la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire, Thrombospondin (Tsp) et Laminin (Lam), reconnues respectivement par les hétérodimères d'intégrines α PS2/ β PS (muscle) et α PS1/ β PS (tendon) (C). Adapté de Schweitzer *et al.*, 2010. Dei : Delilah, β 1Tub : β 1-Tubulin, Kon : Kon-tiki, Drl : Derailed, Lrt : Leucine-rich tendon-specific protein, Sr : Stripe.

myosine II dans la FC qui va à son tour recruter de nouveaux partenaires et amplifier la force de résistance (Kim *et al.*, 2015). Cette balance entre pression exercée par les FCMs « attaquantes » et la résistance des FCs « receveuses » crée une zone de très haute tension corticale au niveau de la SF. Cette tension va alors induire le recrutement des protéines fusogéniques et de protéines impliquées dans la formation des pores membranaires indispensables à la fusion (Shilagardi *et al.*, 2013). Cette dernière étape de la fusion est moins détaillée et demande encore de nouvelles investigations, même si on connaît déjà le rôle des modulateurs du cytosquelette d'actine dans la formation et l'extension des pores ainsi que celui de l'exocytose (Doberstein *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2007).

2. Attachement des fibres musculaires :

D'une façon concomitante avec l'étape de fusion, les fibres musculaires en cours de formation migrent afin de pouvoir s'attacher à l'exosquelette de l'embryon. En effet, la capacité de contraction d'un muscle est dépendante de l'attachement de ce dernier via des tissus conjonctifs appelés tendons. Chez l'embryon de drosophile, le rôle de tendon est assuré par une sous-population de cellules au niveau de l'ectoderme, on parle d'apodèmes ou cellules tendons. L'attachement se déroule en plusieurs étapes avec i) la spécification des précurseurs de tendons, ii) la migration des fibres musculaires vers les sites d'attachement, et enfin iii) la formation de la jonction myotendineuse (Figure 9).

Au sein de chaque parasegment, les cellules tendons sont présentes en bordures antérieure et postérieure, le long de l'axe dorso-ventral, pour les attachements des muscles longitudinaux, acutes et obliques, et en interne pour les muscles transverses. Les précurseurs de tendons sont spécifiés à partir du stade 11 grâce à l'action des signaux de l'ectoderme Wg, Hh, Notch et EGF (Piepenburg *et al.*, 2000 ; Hatini et DiNardo, 2001). Ces signaux vont induire l'expression du facteur de transcription de type EGR-like Stripe (Sr), et plus particulièrement l'isoforme B (Volk et VijayRaghavan, 1994 ; Frommer *et al.*, 1996). L'induction du gène *stripe* est indépendante des muscles à ce stade comme le montre la persistance de cellules Sr positives dans des mutants *twist* (Becker *et al.*, 1997). L'expression de *stripe* est nécessaire et suffisante pour induire la spécification des précurseurs de tendons. En effet, la perte de fonction de *stripe* entraîne une absence de cellules tendons conduisant à une paroi musculaire fortement désorganisée. De plus, l'expression ectopique

de *stripe* dans l'ectoderme permet à elle seule l'expression de gènes caractéristiques des tendons tels que *delilah* (Armand *et al.*, 1994) ou *β1-tubulin* (Buttgereit *et al.*, 1991). Cette expression ectopique de *stripe* dans l'ectoderme, si effectuée précocement à partir du stade 11, provoque aussi des défauts d'attachement. Cette expérience indique que les précurseurs de tendons sont capables d'attirer les fibres musculaires (Vorbrüggen et Jäckle 1997).

En effet, les cellules précurseurs de tendons expriment de nombreux gènes impliqués dans l'attraction des fibres musculaires tels que *slit*, *Leucine-rich tendon-specific protein (Lrt)* et *wnt5* (Kramer *et al.*, 2001 ; Wayburn et Volk, 2009 ; Lahaye *et al.*, 2012). La protéine sécrétée *slit* est un cas particulier car elle possède à la fois un rôle dans la répulsion des fibres en formation au niveau du système nerveux central, mais elle permet aussi l'attraction des fibres musculaires au niveau des précurseurs de tendons (Kidd *et al.*, 1999). En effet, les muscles acutes, obliques et longitudinaux expriment tous les récepteurs de *slit*, *robo* et *robo2*. Les mutants nuls pour *slit* ou ses récepteurs présentent de forts défauts d'attachement où les muscles ne reconnaissent pas leurs sites d'attachement et finissent par s'attacher entre eux. Cependant, ces défauts ne concernent pas les muscles transverses. Ainsi, le processus de migration des muscles vers les précurseurs de tendons apparaît comme un mécanisme complexe régulé différemment selon l'identité et la position des fibres musculaires. Les muscles latéraux transverses (LT1-3), quant à eux, n'expriment pas *robo* ou *robo2* mais un autre récepteur impliqué dans la guidance notamment dans le système nerveux ; il s'agit du récepteur tyrosine kinase atypique *Derailed* (Callahan *et al.*, 1996 ; Bonkowsky *et al.*, 1999). En effet, son ligand *Wnt5* est exprimé par les cellules tendons (et aussi certains muscles) et sa mutation reproduit celle de *derailed* avec notamment des LTs qui dépassent leur site d'attachement et migrent plus loin jusqu'à des sites ectopiques n'exprimant pas le gène *stripe* (Lahaye *et al.*, 2012). Il existe aussi des différences au sein des autres fibres musculaires avec notamment une sous-population de muscles principalement ventraux (VL1-4) exprimant la protéine transmembranaire *Kon-tiki/Perdido* et son partenaire cytoplasmique *Grip* (Schnorrer *et al.*, 2007 ; Estrada *et al.*, 2007). La migration des fibres est guidée par les deux extrémités des fibres via la formation de nombreux filopodes (Schnorrer et Dickson 2004). Dans les mutants *Kon-tiki*, la formation des filopodes est altérée et conduit à une perturbation de la migration. De plus, dans ces muscles ventraux, la protéine *Kon-tiki* joue aussi un rôle dans l'établissement de la jonction

myotendineuse via le recrutement du ligand des intégrines α PS2/ β PS, la protéine de la matrice extracellulaire Thrombospondin (Tsp) exprimée par les cellules tendons (Chanana *et al.*, 2007 ; Subramanian *et al.*, 2007 ; Pérez-Moreno *et al.*, 2017). Un dernier niveau de complexité est représenté par la possibilité de certains muscles comme le DA3 de présenter une phase d'attachement transitoire avant d'acquies sa position finale (Enriquez *et al.*, 2012).

L'établissement de la jonction myotendineuse (MTJ) commence par la différenciation terminale des précurseurs de tendons en cellules tendons. Cette étape de maturation est cette fois sous le contrôle direct des fibres musculaires. La fibre musculaire à proximité de son point d'attachement va, par le biais de la sécrétion du ligand de la voie EGF Vein, induire l'augmentation de l'activité de la voie Ras-MAPK dans la future cellule tendon (Yarnitzky *et al.*, 1997). Cette activation se traduit par l'expression dans les cellules tendon de l'isoforme A de *stripe*, ainsi que par la forte expression des gènes impliqués dans la mise en place de la MTJ. Les cellules précurseurs de tendons non sélectionnées perdent l'expression de *stripe* pour retrouver un destin épidermal. L'établissement de la MTJ repose principalement sur le rôle des hétérodimères d'intégrines dans l'ancrage des cellules tendons et musculaires à une matrice extracellulaire (MEC) conférant ses propriétés élastiques à la MTJ. Il a pu être montré que les fibres musculaires expriment l'hétérodimère α PS2/ β PS (Brown, 1994 ; Bunch *et al.*, 1998) qui se lie spécifiquement aux composants de la MEC Tigrin et Tsp (Chanana *et al.*, 2007 ; Subramanian *et al.*, 2007 ; Fogerty *et al.*, 1994 ; Bunch *et al.*, 1998). En parallèle, les cellules tendons expriment l'hétérodimère α PS1/ β PS (Prokop *et al.*, 1998) qui reconnaît la Laminin, un autre des constituants de la MEC dans les MTJ (Gotwals *et al.*, 1994 ; Martin *et al.*, 1999). Au cours de la différenciation des cellules tendon, ces dernières sécrètent les protéines Tsp et Laminin. Les muscles sécrètent quant à eux la protéine Tigrin qui joue un rôle mineur dans la MTJ mais permet aussi l'adhésion des fibres musculaires entre elles (Bunch *et al.*, 1998). Les autres constituants de la MTJ présentés précédemment sont tous indispensables puisque les mutants nuls de ces protéines aboutissent à la formation de MTJ non fonctionnelles conduisant au détachement des muscles. Finalement, la bonne mise en place de la MTJ est nécessaire pour l'étape de sarcomérogenèse qui comprend la mise en place des sous-unités contractiles appelées sarcomères, et composées majoritairement de protéines structurales telles que la chaîne lourde de la myosine, l' α -actinine et l'homologue

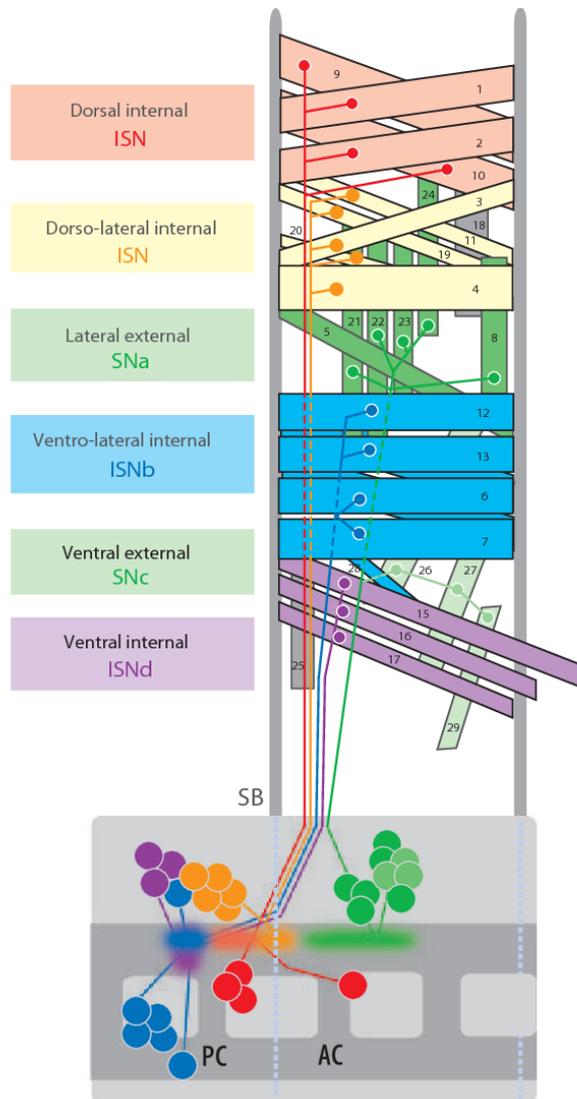


Figure 10: Innervation de la paroi musculaire

Les domaines musculaires et les branches nerveuses qui les innervent sont représentés avec des couleurs correspondantes. La majorité des projections des motoneurones formant les branches intersegmentales (ISN, ISNb et ISNd) traversent la frontière segmentale (SB). Les muscles 14 et 30 (VO1 et VO2) ne sont pas représentés sur cette figure mais sont innervés par l'ISNb. Les muscles 25 (VT1) et 18 (DT1) sont respectivement innervés par le nerf transverse (TN) et l'ISN. AC, commissure antérieure; PC, commissure postérieure. Adapté de Kohsaka *et al.*, 2012.

de la Titine Sallimus (voir revue Sparrow et Schöck, 2009). Cette dernière étape permettra *in fine* d'aboutir à une fibre musculaire contractile et donc fonctionnelle.

VIII. Mise en place de l'innervation des fibres :

1. Aperçu du système nerveux moteur :

Afin de pouvoir déclencher les contractions volontaires du muscle, ce dernier doit être correctement associé au système nerveux qui va ainsi pouvoir transmettre un potentiel d'action responsable de l'initiation de la contraction. Chez la drosophile, l'innervation du muscle est assurée par des motoneurones présents dans le système nerveux central (CNS), au niveau de la corde ventrale de l'embryon. Les fibres musculaires d'un hémisegment sont innervées par approximativement 36 motoneurones (MNs). La nomenclature des motoneurones est basée sur leur lignage, leur position au sein du CNS, leur projection axonale ou encore leur arborisation dendritique. De plus, les motoneurones sont, comme les FCs, caractérisés par un code d'expression de facteurs de transcription. Au sein du CNS, les motoneurones sont principalement identifiables par la projection latérale d'axones vers le territoire musculaire. Ces projections sont regroupées en deux branches principales, le nerf intersegmental (ISN) et le nerf segmental (SN), ainsi qu'une secondaire appelée le nerf transverse (TN) (Figure 10). L'ISN innerve les muscles internes via 3 branches différentes : l'ISN qui innerve les muscles dorsaux et dorso-latéraux, l'ISNb et l'ISNd qui innervent les muscles ventraux (Landgraff *et al.*, 1997). Le nom « intersegmental » provient de la position occupée par la majorité des MNs qui la constituent. En effet, ces MNs projettent leurs axones dans le segment postérieur à celui qu'ils occupent. A l'inverse, les MNs qui forment la branche SN se situent au sein du même segment (Thomas *et al.*, 1984). Comme pour l'ISN, la SN se divise en deux branches SNa et SNc qui vont innerver respectivement les muscles externes latéraux et ventraux. Les différentes expériences de traçage par analyses clonales et injection de colorant ont permis de mettre en place une carte de l'innervation des muscles au cours de l'embryogenèse (Landgraff *et al.*, 1997 ; Schmid *et al.*, 1999). Ces études ont permis de montrer que la plupart des muscles ne sont innervés que par un seul MN à l'inverse du stade larvaire. En effet, les muscles larvaires sont tous innervés par un ou plusieurs MNs (Hoang et Chiba 2001). Cette distinction s'observe par les différents types de jonctions neuromusculaires caractérisées par la forme des boutons synaptiques et le type de

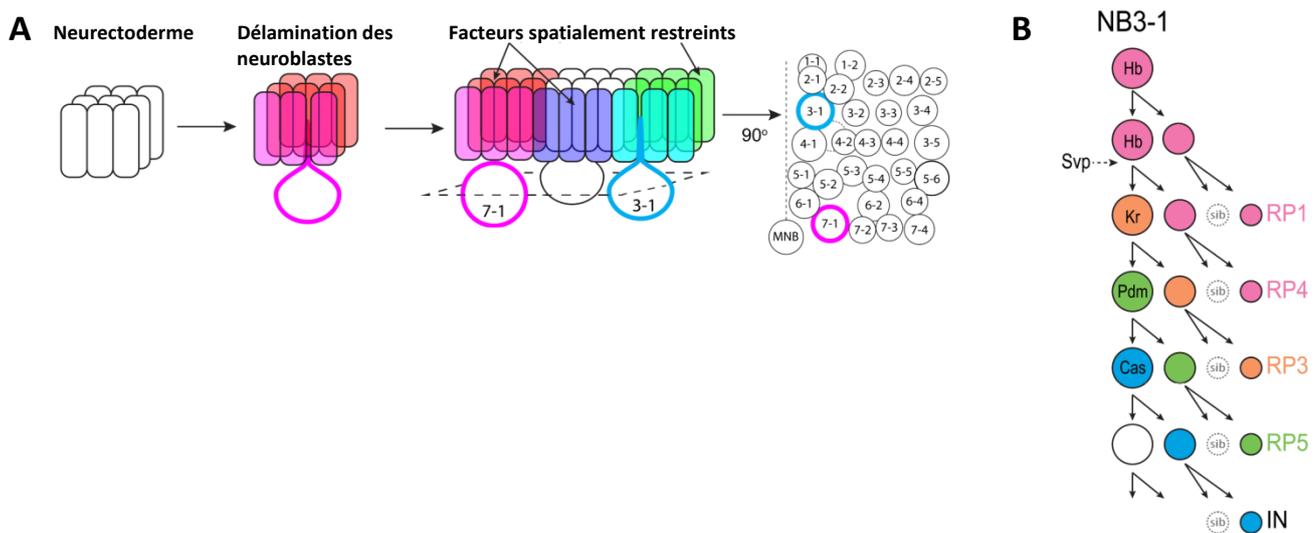


Figure 11: Formation et division des neuroblastes

A. Les neuroblastes sont spécifiés par délamination dans le neurectoderme. Chaque neuroblaste est identifiable par une position stéréotypée et l'expression de facteurs spatialement restreints. Les neuroblastes sont dénommés par rapport à leur position dans une « grille » de neuroblastes constituée de 7 lignes et 3 colonnes majeures. Par exemple, le neuroblaste 3-1 est le premier neuroblaste de la ligne 3. **B.** Chaque neuroblaste se lance dans une série de divisions asymétriques donnant naissance à une cellule différenciée, appelée Ganglion Mother Cell (GMC), et un neuroblaste qui continuera à se diviser. Les GMCs se divisent à nouveau pour former deux neurones ou cellules gliales. Les divisions des neuroblastes sont sous le contrôle d'une cascade de facteurs de transcription temporels, et donneront naissance à des lignages uniques. Le neuroblaste 3-1 exprime successivement Hunchback (Hb), Seven-up (Svp) de façon transitoire, Kruppel (Kr), Pou domain protein (Pdm), et Castor (Cas). Adapté de Kohwi et Doe, 2013.

neurotransmetteur. Bien que les 4 types référencés expriment le glutamate (Johansson *et al.*, 1989), les types Ib et Is sont uniquement glutamatergiques, les types II (3 MNs) et III (2MNs) expriment respectivement l'octopamine et l'insuline (Monastirioti *et al.*, 1995 ; Gorczyca *et al.*, 1993 ; Landgraaf *et al.*, 2003). Ainsi, chaque muscle larvaire peut être innervé par jusqu'à 4 MNs différents comprenant au maximum un seul de chaque type (Hoang et Chiba 2001).

2. Formation des motoneurones :

Au cours de l'embryogenèse, le CNS se développe à partir du neuroectoderme en position ventrale dès le début du stade 9. Sous l'influence notamment des gènes du complexe *achaete scute* et de la voie N (Lehmann *et al.*, 1981; Jiménez et Campos-Ortega 1982 ; voir revue Skeath et Carroll 1994), mais aussi de gènes de polarité segmentaire tels que *midline*, *wg* ou *gooseberry* (Buesher *et al.*, 2006 ; Chu-LaGraff et Doe, 1993 ; Skeath *et al.*, 1995), des cellules progénitrices appelées neuroblastes sont sélectionnées au cours de 5 vagues de délamination successives. Ces cellules se retrouvent entre l'ectoderme et le mésoderme, et forment le CNS primordial. On distingue un réseau stéréotypé de 30 neuroblastes par segments répartis en 7 lignes selon l'axe A/P et 3 colonnes majeures selon l'axe D/V (Doe 1992) (Figure 11A). Ces neuroblastes vont ensuite subir une succession de divisions asymétriques. Ces divisions asymétriques donnent naissance à une cellule fille appelée ganglion mother cell (GMC) et un neuroblaste qui va à son tour continuer à se diviser asymétriquement. Ces divisions asymétriques font notamment intervenir, comme pour les progéniteurs musculaires, la répartition asymétrique des protéines Numb et Inscutable (Rhyu *et al.*, 1994 ; Kraut *et al.*, 1996). De plus, il a pu être mis en évidence que ces divisions successives (environ une par heure) sont aussi régulées par un code de facteurs de transcription séquentiels (Isshiki *et al.*, 2001) (Figure 11B). Par exemple, le neuroblaste 3-1 exprime tout d'abord le facteur de transcription à doigts de zinc Hunchback (Hb) puis après la deuxième division, l'expression transitoire de Seven-up réprime Hb pour permettre la transition vers l'expression de Kr (Kanai *et al.*, 2005). Puis, la perte de Kr est suivie par l'expression de Pou domain protein (Pou) après la troisième division, et enfin la quatrième division est marquée par la transition de Pou vers le facteur de transcription Castor (Cas) (Tran et Doe, 2008). Pou et Cas répriment respectivement Kr et Pou. Ainsi les divisions des

neuroblastes représentent un modèle d'horloge moléculaire via un code de facteurs d'identité temporel. Les GMCs formées à partir des neuroblastes se divisent à leur tour pour donner naissance aux neurones post-mitotiques et aux cellules gliales. Au cours de l'embryogenèse, on observe la formation dans chaque segment d'approximativement 30 cellules gliales et 350 neurones comprenant différentes sous-populations d'interneurones et environ 70 motoneurones.

3. Identité des motoneurones :

Les MNs peuvent être regroupés en fonction des branches dans lesquelles ils projettent leurs axones. Ainsi, on peut distinguer les MNs dorsaux (dMNs) pour l'ISN, les MNs ventraux (vMNs) pour l'ISNb et l'ISNd et les MNs latéraux (lMNs) qui projettent au niveau de la SN. Ces groupes de MNs sont caractérisés par l'expression de facteurs de transcription (FTs) spécifiques leur conférant une identité associée à la branche qu'ils composent. Les dMNs expriment spécifiquement le FT Eve (Landgraf *et al.*, 1999), le FT de type GATA Grain (grn) (Garces et Thor, 2006) et le FT ubiquitaires au sein des MNs Zfh1 (Layden *et al.*, 2006). De plus, Eve est nécessaire et suffisant pour diriger les axones des dMNs vers les muscles dorsaux. En parallèle, les vMNs expriment les FTs islet/tailup, Lim-3, Nkx6 et Hb9 (Thor et Thomas, 1997 ; Thor *et al.*, 1999 ; Broihier et Skeath, 2002; Broihier *et al.*, 2004). Parmi ces FTs il a pu être montré que Hb9/Nkx6 et Eve se répriment mutuellement, conférant ainsi une identité dorsale et ventrale aux MNs de l'ISN. Au sein des vMNs, des FTs exprimés différenciellement entre les MNs de l'ISNb et de l'ISNd ont été découverts. Les MNs de l'ISNb sont caractérisés par la présence du FT bHLH Oli (Oyallon *et al.*, 2012), la FT à domaine POU Drifter (Certel et Thor, 2004) et le gène homéotique *ultrabithorax* (Hessinger *et al.*, 2017). Pour la population de MNs à l'origine de la SN, on ne connaît pas de FTs spécifiques aux MNs de la SNC. En revanche, les MNs de la SNa expriment les FTs Oli, Hb9 et les FTs à homéoboite BarH1/H2 (Oyallon *et al.*, 2012 ; Broihier et Skeath, 2002 ; Garces *et al.*, 2006)

Malgré les nombreux FTs identifiés au sein de sous-populations de MNs, on ne sait toujours pas comment chaque MN est capable d'acquérir une identité propre. En effet, chaque motoneurone se distingue par des caractéristiques morphologiques et un profil d'innervation qui lui est propre même au sein d'une même sous-population. Par exemple, les MNs aCC et RP2 sont considérés comme des MNs « pionniers » de l'ISN permettant de

guider les autres MNs (Lin *et al.*, 1995, Garces et Thor 2006). Ces deux MNs sont pourtant issus de deux neuroblastes différents mais possèdent le même code de FTs avec l'expression de *eve*, *zfh1* et *grain*. Cependant, il a pu être démontré que la hiérarchisation de ces trois FTs est différente entre aCC et RP2 (Garces et Thor 2006). Si les FTs déjà identifiés ne suffisent pas encore à expliquer les mécanismes sous-jacents à l'identité de chaque MN, on sait que la majorité de ces FTs permettent l'expression spécifique à certains MNs de gènes impliqués dans la guidance et la navigation de leurs axones.

4. Guidance des axones :

Bien que le développement des muscles soit indépendant de celui du système nerveux moteur (Broadie et Bate 1993), la défasciculation des axones des MNs est dépendante de la présence des fibres musculaires (Landgraf *et al.*, 1999). En effet, après la sortie du CNS les axones regroupés en différentes branches doivent naviguer au sein du champ musculaire afin de pouvoir innover leurs cibles musculaires. Ces processus de navigation et d'innervation terminale sont finement régulés sous le contrôle de nombreux signaux relayés par des ligands sécrétés ou des protéines d'adhérence.

Historiquement, les premières molécules identifiées comme jouant un rôle dans l'innervation appartiennent à la famille des molécules d'adhérence cellulaire (CAMs) homophiliques. Parmi ces molécules, on peut notamment citer Fasciclin 2 (Fas2), exprimée dans l'ensemble des axones moteurs et plus faiblement dans l'ensemble des muscles (Grenningloh *et al.*, 1991 ; Davis *et al.*, 1997). Cependant, la mutation nulle de *fas2* n'induit pas de phénotype réel sur la guidance (Grenningloh *et al.*, 1991). En revanche, des expériences de surexpression de Fas2 dans les MNs montrent l'apparition de défauts de fasciculation pouvant conduire à l'arrêt de la migration (Lin et Goodman, 1994). De même, la surexpression de Fas 2 dans les muscles conduit à des défauts de mise en place des MNJs (Davis *et al.*, 1997). D'autres molécules d'adhérence sont exprimées dans les axones des MNs telles que Fasciclin 3 (Fas3) ou encore les protéines de la famille des LRRs Con, Capricious (Caps) et Tartan (Trn) (Nose *et al.*, 1992, 1997 ; Chiba *et al.*, 1995 ; Shishido *et al.*, 1998 ; Kurusu *et al.*, 2008). Cependant, comme pour *fas2*, les pertes de fonction des gènes associés n'ont encore une fois pas ou peu de réel phénotype sur la trajectoire et l'innervation des axones. Par exemple, même si Caps est exprimée dans 8 muscles différents,

seul le VL1 présente des défauts d'innervation dans un mutant nul (Shishido *et al.*, 1998). D'un autre côté, l'expression ectopique de ces molécules dans les MNs ou dans les muscles provoque l'apparition de phénotypes avec notamment l'innervation ectopique de nouveaux muscles. Ces expériences démontrent un fort niveau de complexité en ce qui concerne la régulation des processus de fasciculation, défasciculation et reconnaissance des partenaires des axones avec de nombreuses protéines impliquées, pour beaucoup redondantes dans leurs fonctions.

En parallèle, de nouvelles familles de molécules ayant un impact sur la guidance ont été identifiées. La famille Slit/Robo joue majoritairement un rôle dans la mise en place des axones au sein du CNS (Seeger *et al.*, 1993 ; Kidd *et al.*, 1998), mais il a aussi été montré que la surexpression de slit dans les muscles induit un défaut d'innervation des muscles VLs (Kidd *et al.*, 1999). Un autre groupe impliqué dans la navigation des axones est constitué par les protéines de guidance Semaphorins et Plexins. Les deux récepteurs Plexin A (PlexA) et Plexin B (PlexB) reconnaissent les protéines transmembranaires Sema-1a, Sema-1b et Sema-5c pour PlexA, et les protéines sécrétées Sema-2a et Sema-2b pour Plex B (Kolodkin *et al.*, 1993). Mis à part Sema-1b et Sema-5c (Khare *et al.*, 2000), ces protéines jouent de nombreux rôles dans la fasciculation et dans la guidance des axones moteurs (Winberg *et al.*, 1998 ; Ayoob *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 1998). Parmi les premières molécules sécrétées impliquées dans l'attraction et la répulsion des axones, on retrouve les Netrins codées par deux gènes chez la drosophile, *NetA* et *NetB* (Mitchell *et al.*, 1996 ; Harris *et al.*, 1996). Les Netrins sont exprimées dans le CNS, dans des sous-populations de muscles dorsaux et ventraux, ainsi qu'au niveau des bordures de segments. La signalisation des Netrins passe par deux récepteurs : Frazzled (Fra) impliqué dans l'attraction et la répulsion, et Unc-5 principalement lié à la répulsion des axones (Kolodziej *et al.*, 1996 ; Keleman et Dickson, 2001). L'expression de Unc-5 dans l'ISN et dans la SNa permet notamment d'éviter le franchissement des bordures de segments par ces axones (Labrador *et al.*, 2005). De son côté, Fra, retrouvé dans l'ISN et dans l'ISNb, est par exemple impliqué dans l'innervation de deux muscles ventraux (VL3-4) exprimant NetB probablement par attraction (Kolodziej *et al.*, 1996). On peut aussi mentionner les récepteurs tyrosine phosphatase Dlar, Ptp69D and Ptp52F (Krueger *et al.*, 1996 ; Desai *et al.*, 1996 ; Schindelholz *et al.*, 2001), les métalloprotéases MMP1, MMP2 et Tolloid related (Miller *et al.*, 2008 ; Meyer et Aberle,

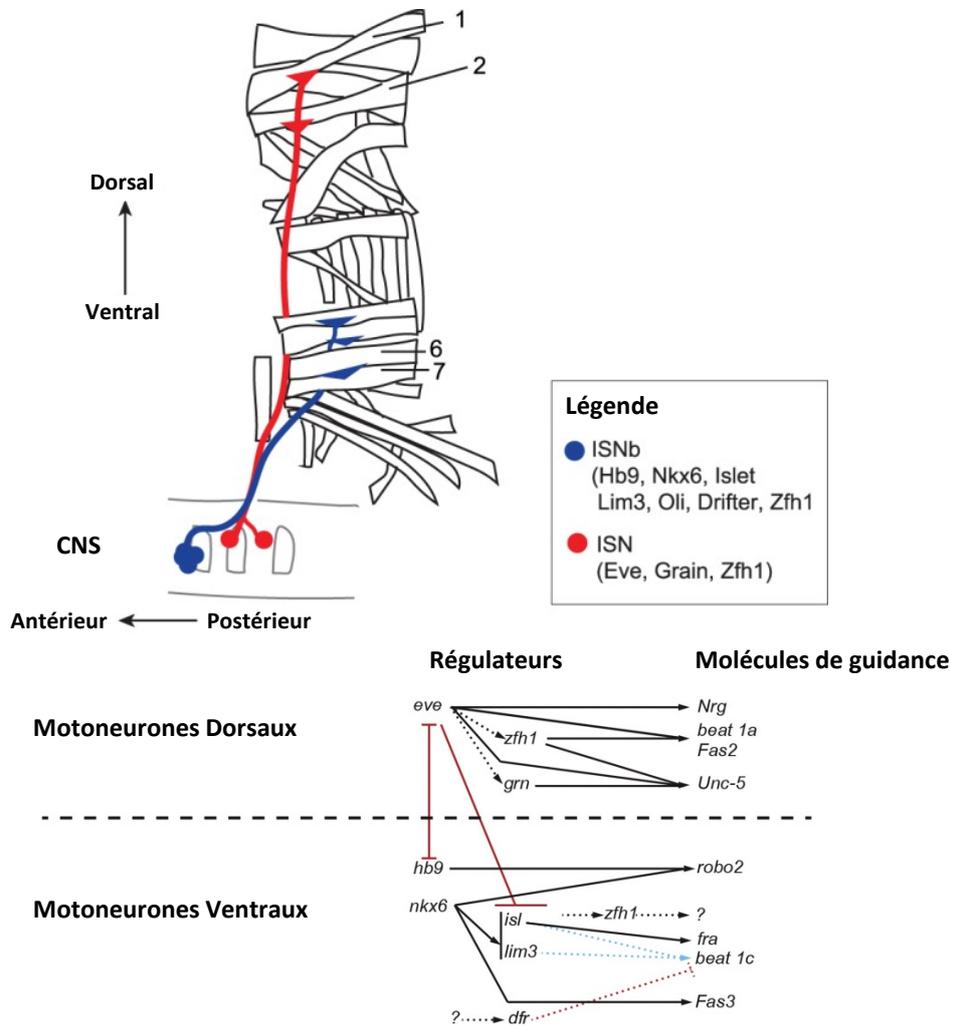


Figure 12: Régulation transcriptionnelle de la guidance des motoneurones dorsaux et ventraux

Représentation de l'innervation des muscles par l'ISN et l'ISNb, ainsi que des facteurs de transcription (FTs) exprimés par les motoneurones (MNs) à l'origine de ces branches, responsables de la guidance. La hiérarchie des FTs est représentée de droite à gauche. Les lignes noires représentent l'activation, et les lignes rouges les interactions répressives. Les lignes en pointillés symbolisent l'activation de *zfh1* et *grain (grn)* uniquement dans le MN dorsal aCC mais pas dans le RP2. Pour les MNs ventraux, les pointillés représentent des incertitudes (en noir) ou des suppositions (en bleu) avec *islet* et *lim3* qui activeraient directement *beat-1c* dans les MNs du nerf transverse (TN). Adapté de Santiago et Bashaw, 2014, et Zarin et Labrador, 2017.

2006), ainsi que la protéine Activin-like Dawdle et son récepteur Baboon (Parker *et al.*, 2006) qui possèdent tous un rôle dans les processus d'innervation principalement observés au niveau de l'ISNb et la SNa.

Un dernier groupe de gènes induisant des défauts de navigation des axones contient les gènes *beaten path* (*beat-1a*) et *sidestep* (*side*) (Fambrough et Goodman 1996 ; Sink *et al.*, 2001). Bien qu'identifiés séparément, les pertes de fonction de ces deux gènes présentent des phénotypes similaires avec notamment un arrêt de la navigation de l'ISN, des défauts de fasciculation des ISNb et ISNd, et des pertes de branches de la SNa et SNc. Ils appartiennent tous deux à la superfamille des Immunoglobulines, et font partie de sous-familles comprenant 14 Beats sécrétés ou transmembranaires, et 8 Sides transmembranaires (Pipes *et al.*, 2001 ; Ozkan *et al.*, 2013). Il est désormais admis que Beat-1a agit comme un récepteur dans les axones qui va reconnaître Side exprimé dans certains muscles et dans le système sensoriel (Sink *et al.*, 2001), induisant une progressive régulation négative de l'expression de Side jusqu'à atteindre sa cible musculaire (Siebert *et al.*, 2009). Beat-1a et Side sont aujourd'hui considérés comme des acteurs majeurs de la défasciculation et de la navigation des axones; et l'étude des autres membres de leurs familles permettra d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'innervation (Li *et al.*, 2017).

L'expression de ces différents acteurs au sein des MNs est progressivement associée à la combinatoire de facteurs de transcription qu'ils expriment (Figure 12). On peut citer le facteur de transcription Islet qui est requis dans le MN RP3 de l'ISNb pour l'expression de Fra nécessaire pour l'innervation des VL3-4 (Santiago et Bashaw, 2017). Dans ces même MNs RP3, il a été montré que le facteur de transcription Hb9 est requis pour l'expression du récepteur Robo2 (Santiago *et al.*, 2014). Les facteurs de transcription Islet et LIM-3 sont aussi nécessaires pour l'expression de Beat-1c dans les MNs de la TN (Pipes *et al.*, 2001 ; Certel et Thor 2004). La perte de fonction de *beat-1c* affecte la TN avec des innervation ectopiques dans le domaine ventral, mais aussi le lateral bipolar dendrite (LBD), décrit à l'origine comme un neurone sensoriel apposé sur le SBM innervant les muscles alaires et dont les projections sont rejointes par la TN (Gorczyca *et al.*, 1994). L'un des meilleurs exemples de régulation par un code de facteurs de transcription est illustré par les MNs pionniers de l'ISN RP2 et aCC. Comme décrit précédemment, ces MNs expriment les facteurs de transcription Eve, Grn et Zfh1. L'absence de *zfh1* induit de nombreux phénotypes allant d'axones tronqués,

d'absence de défasciculation à des défauts de sortie du CNS (Layden *et al.*, 2006). Paradoxalement, le sauvetage des mutants par une expression de Zfh1 dans les MNs ne suffit pas à restaurer l'ensemble des phénotypes suggérant un rôle du Zfh1 mésodermal. Les mutants pour *eve* et *grn* partagent le même phénotype sur la croissance de l'ISN avec une branche qui s'arrête au niveau de la région dorso-latérale (Landgraf *et al.*, 1999 ; Garces et Thor, 2006). Ces trois facteurs exercent une action combinée sur 4 cibles impliquées dans la guidance de l'ISN. Le facteur Eve induit l'expression de la molécule d'adhésion Neuroglian, et coopère avec Zfh1 dans l'activation de *beat-1a*, *Unc-5* et *Fas2* (Zarin *et al.*, 2014). En parallèle, Grn n'agit que sur la transcription de *Unc-5* (Zarin *et al.*, 2012). Ces données illustrent l'importance de la coopération de ces différents facteurs sur leurs cibles communes.

En résumé, l'innervation spécifique des fibres musculaires par le/les MNs correspondant(s) est un processus complexe qui met en jeu un grand nombre de molécules d'adhésion et autres signaux sécrétés. Cette phase requiert une coopération subtile entre cible musculaire et MNs. Ainsi, les muscles sont des partenaires actifs dans la prise de décision des axones au cours de leur navigation. Il est intéressant de préciser que les muscles utilisent aussi des projections cytoplasmiques ou myopodes afin de guider les axones pour pouvoir former la jonction neuromusculaire (NMJ) (Ritzenthaler *et al.*, 2000). Par exemple, il a pu être montré que les myopodes du VL1 concentrent la protéine d'adhésion Caps à leur extrémité afin de faciliter la reconnaissance de leur partenaire axonal (Kohsaka et Nose, 2009). Cependant, il est aussi important de souligner que la navigation des axones ne repose pas entièrement sur le tissu musculaire, et peut aussi mettre en jeu d'autres acteurs tels que les cellules gliales périphériques et le système nerveux sensoriel.

5. Le système nerveux sensoriel et ses projections :

Le système sensoriel de la drosophile est constitué d'environ 45 organes sensoriels (ou sensilla) dérivés de l'ectoderme au cours de l'embryogenèse (Figure 13). Ils sont divisés en 3 sous-catégories : i) les organes sensoriels externes (es) qui sont des récepteurs qui détectent des signaux mécaniques et chimiques, ii) les organes chordotonaux (ch), des mécanorécepteurs ciliés en forme de tube, et iii) les neurones multidendritiques (md) qui se présentent comme des neurones sensoriels isolés ou en groupe de 2 à 5 cellules. Les md

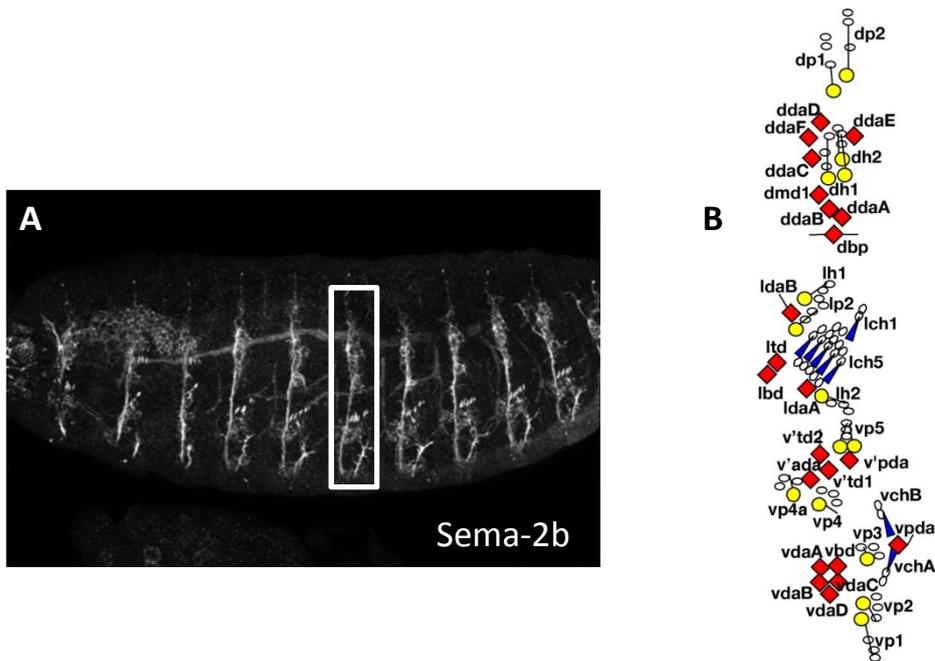


Figure 13: Neurones sensoriels périphériques embryonnaires

A. Vue latérale d'un embryon de stade 16 montrant le système nerveux sensoriel révélé grâce à un anticorps contre Sema-2b. **B.** Représentation schématique des neurones sensoriels d'un hémisegment. Cercles jaunes : organes sensoriels externes. Triangles bleus : organes chordotonaux. Losanges rouges : neurones multidendritiques. Adapté de Orgogozo et Grueber, 2005.

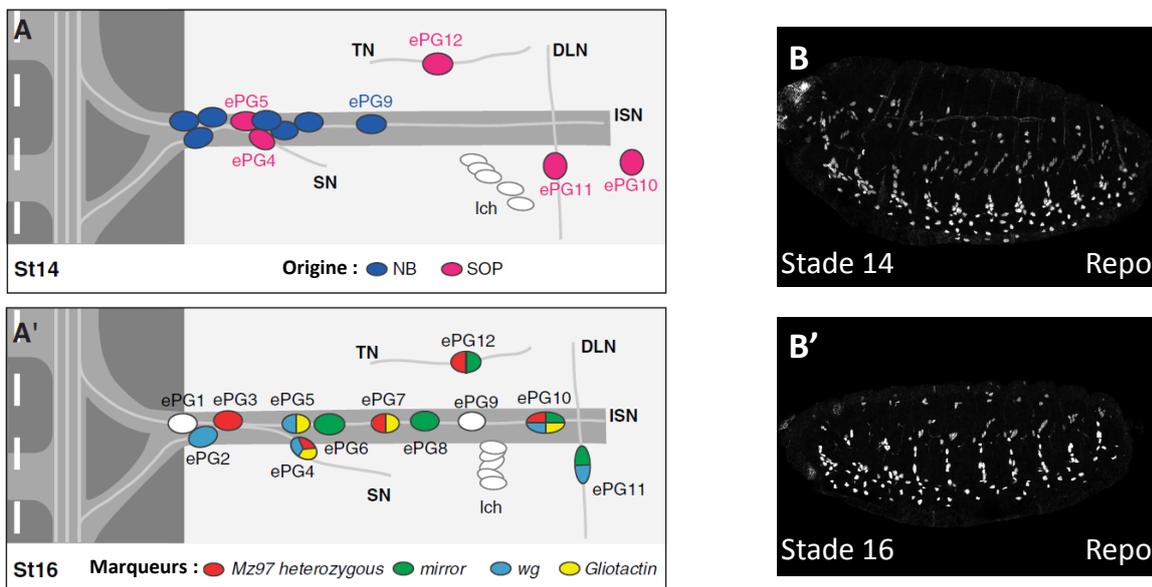


Figure 14: Description des cellules périphériques gliales au cours de l'embryogenèse

A. Représentation schématique des cellules périphériques gliales (PGs) au sein d'un hémisegment d'un embryon de stade 14. On distingue 7 PGs d'origine neuroblastique (NB) et 5 qui proviennent des précurseurs des organes sensoriels (SOP). **A'.** Positionnement des PGs au stade 16 après migration. Certains marqueurs des PGs sont aussi représentés. **B-B'.** Vues latérales d'embryons au stade 14 et 16 marqués par un anticorps dirigé contre le facteur de transcription glial Reverse polarity (Repo). Adapté de Ohayon *et al.*, 2009.

peuvent être subdivisés en 3 catégories (Bodmer et Jan, 1987) avec les neurones qui innervent les trachées (td), les neurones présentant une arborisation dendritique (da), et les neurones exhibant des dendrites bipolaires (bp). Les neurones da sont classés de I à IV en fonction de leur arborisation dendritique de la plus simple (I) à la plus complexe (IV) (Sweeney *et al.*, 2002, Grueber *et al.*, 2002).

Les différents organes sensoriels peuvent être associés en 3 groupes projetant leurs axones pour rejoindre le CNS. Les projections axonales des neurones sensoriels rejoignent les axones moteurs formant ainsi des pistes pour ces derniers (Campos-Ortega et Hartenstein, 1997). Le groupe dorsal est constitué de 5 es et 8 md, et le groupe latéral composé de 3 es, 6 ch et 4 md, projettent tous les deux au niveau de l'ISN (à l'exception du lch1). Le groupe ventral formé par 7 es, 2ch et 10 md, projettent des axones qui sont rejoints par les SNa et SNc, ainsi que l'ISNb (Merritt et Whittington, 1995 ; Orgogozo et Grueber 2005). Il a pu être montré que cette association entre axones afférents sensoriels et efférents moteurs passe par l'expression de sidestep pour les axones sensoriels et beat-1a pour les moteurs (Siebert *et al.*, 2009). Après la sortie du CNS, les branches principales ISN et SN suivent donc une piste formée par l'expression progressivement restreinte de Sidestep dans les axones sensoriels.

6. Les cellules gliales périphériques :

Les cellules gliales sont des cellules qui ont un rôle de soutien dans le développement et les fonctions des neurones. On distingue plusieurs catégories de cellules gliales. Parmi ces cellules, les cellules gliales périphériques (PGs) sont importantes pour la formation et la protection du système nerveux périphérique. Au sein de chaque hémisegment on distingue la présence de 12 PGs à des positions stéréotypées le long des nerfs du système nerveux périphérique (von Hilchen *et al.*, 2008) (Figure 14). Parmi ces cellules, 7 sont issues du CNS à partir des divisions des neuroblastes 1-3, 2-5 et 5-6 (Schmidt *et al.*, 1997 ; De Graeve *et al.*, 2004). Ces PGs migreront par la suite le long des nerfs sous l'influence notamment de la protéine d'adhésion Fas2 et du récepteur Unc-5 (Silies et Klämbt, 2010 ; von Hilchen *et al.*, 2010). Les cinq autres PGs, dont le lateral bipolar dendritic neuron (LBD ou PG12, qui n'est donc plus considéré comme neurone sensoriel) proviennent des divisions des précurseurs des organes sensoriels. Bien que formant une population hétérogène en rôles et marqueurs

(von Hilchen *et al.*, 2013), ces cellules expriment de nombreux gènes d'identité communs tels que les facteurs de transcription *reverse polarity (repo)* (Halter *et al.*, 1995), *zfh1* (Ohayon *et al.*, 2009) ou encore le régulateur du destin glial *glide/glia cell missing (gli/gcm)* (Hosoya *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1996). En plus du rôle des PGs dans la formation d'une gaine protectrice autour des axones, il a pu être montré que ces cellules de soutien agissent aussi sur la sortie du CNS des axones moteurs (Hidalgo et Booth, 2000) et sur la guidance des axones sensoriels et moteurs (Takizawa et Hotta, 2001 ; Sepp *et al.*, 2001). En effet, l'absence de cellules gliales dans un mutant pour *gcm* est corrélée à des phénotypes de perturbations des projections du système nerveux périphérique. Il a ensuite été montré que ces défauts dépendent de l'activation de la voie EGF dans les PGs (Sepp et Auld, 2003). Cependant, il faut noter que les défauts majeurs observés dans ces études sont sur les axones sensoriels. Pour les axones moteurs il s'agit principalement de défauts d'organisation et de fasciculation/défasciculation des axones. Le guidage terminal pour atteindre les muscles n'est que peu affecté (Sepp *et al.*, 2001).

Il existe un autre type cellulaire en lien avec le système nerveux au cours de l'embryogenèse. Il s'agit des précurseurs de muscles adultes (AMPs). Ces cellules sœurs des FCs sont en étroit contact avec l'ISN et la SN mais n'ont que très peu été étudiées pour leur rôle dans la mise en place du système nerveux moteur.

IX. Les précurseurs de muscles adultes ou AMPs :

1. Découverte et description des AMPs :

Chez les insectes holométaboles dont fait partie la drosophile, l'existence de deux vagues de myogenèse a poussé les chercheurs à comprendre l'origine de cette deuxième vague au cours de la métamorphose. Les premières expériences de transplantation de disques imaginaux de pattes (Ursprung *et al.*, 1972) ont mis en évidence que les disques possèdent une source de cellules pouvant former les muscles adultes. Il a ensuite pu être démontré que cette sous-population était composée de cellules dites adépathéliales (nommées ainsi à cause de leur association à la surface interne des disques) (Poodry et Schneiderman, 1970). En effet, des analyses de l'ultrastructure des disques de pattes ont révélé que ces cellules

s'alignent et fusionnent entre elles au cours de la pupation afin de former les fibres musculaires adultes (Reed *et al.*, 1975). Il a finalement pu être démontré que la transplantation de fragments de disques d'aile contenant ces cellules était suffisante pour participer à la formation des muscles (Lawrence et Brower, 1982). D'une façon plus surprenante, ces mêmes cellules adépathéliales (ou myoblastes), bien que contribuant à la formation de muscles spécifiques durant le développement normal (Lawrence, 1982), ont la capacité de participer à la formation de divers muscles si transplantées de façon ectopique.

Même si des évidences semblaient indiquer que ces myoblastes à l'origine de la musculature adulte possèdent une origine mésodermique embryonnaire ou larvaire (Lawrence, 1982), il faudra attendre le début des années 90 pour identifier définitivement l'origine de ces cellules. Ainsi, les précurseurs de muscles adultes ou AMPs ont été mis en évidence en 1991 par M.Bate. Ces cellules sœurs des cellules fondatrices (Carmena *et al.*, 1995) sont caractérisées par le maintien de l'expression de twist (on les appelle alors « cellules twist persistantes ») (Bate *et al.*, 1991). Ces cellules sont présentes à des positions stéréotypées au sein des segments thoraciques et abdominaux. On distingue 6 AMPs par hémisegment abdominal en position ventrale (vAMP), latérale (2 lAMPs), dorso-latérale (2 dlAMPs) et dorsale (dAMP). Dans les segments thoraciques, les lAMPs et vAMPs ne sont pas distinguables et forment des clusters de 6 à 10 cellules AMPs associées aux primordium des disques imaginaux. Cette différence est directement sous le contrôle des gènes Hox (Greig et Akam, 1993). L'expression ectopique d'Abdominal A dans le mésoderme conduit à la perte des groupes d'AMPs thoraciques, au profit d'un motif abdominal d'AMPs dans les segments thoraciques.

L'ablation des AMPs par traitement des larves avec un inhibiteur de la synthèse d'ADN, l'hydroxyurée, permet d'identifier les AMPs comme uniques contributeurs à la formation des muscles adultes (Broadie et Bate, 1991). Par exemple, l'ablation totale des AMPs latérales est corrélée avec la disparition totale des fibres musculaires adultes de la région latérale. De la même manière, des ablations incomplètes sont observées pour les groupes d'AMPs qui sont cette fois corrélées avec des fibres musculaires adultes possédant un nombre réduit de noyaux par fibre. De ces expériences deux conclusions ont été proposées en ce qui concerne la région abdominale. L'absence d'identité individuelle au sein d'un même groupe, mais aussi l'absence de compensation d'un groupe d'AMPs par rapport à un autre. Cette dernière

sera raffinée quelques années plus tard par l'utilisation de l'ablation laser sur des groupes spécifiques d'AMPs en région latérale ou ventrale (Farrell et Keshishian, 1999). En effet, l'ablation en larve d'un groupe de IAMPs ne suffit pas à provoquer la disparition des fibres adultes correspondantes. Il a pu être montré que les IAMPs de segments adjacents sont capables de coloniser le segment dépourvu d'AMPs, illustrant ainsi une absence de restrictions segmentales des AMPs. Bien que les AMPs diffèrent des FCs en ce point, seules des AMPs partageant une identité commune sont concernées.

2. Spécification des AMPs au cours de l'embryogenèse :

Les AMPs sont donc issues de la division asymétrique des progéniteurs musculaires (PCs). Les nombreuses études effectuées sur le lignage des cellules fondatrices ont permis d'identifier les progéniteurs à l'origine de ces cellules. L'origine de la vAMP a été la première identifiée (Carmena *et al.*, 1995). Cette dernière provient de la division du PC ventral S59 et Poxm positif qui donnera, par divisions successives, les FCs des muscles VA1, VA2, VA3 et la vAMP (Duan *et al.* 2007 ; Ruiz-Gomez et Bate 1997). Les deux IAMPs sont spécifiées à partir du PC exprimant les gènes d'identité *org-1* et *lb* qui donnera 4 cellules comprenant les deux IAMPs, la cellule fondatrice du SBM et une cellule qui rentrera ensuite en apoptose (Jagla *et al.*, 1998 ; Schaub *et al.*, 2012). En ce qui concerne les dIAMPs, ces deux cellules bien qu'associées d'un point de vue positionnel, ne semblent pas issues des mêmes progéniteurs. En effet, la dIAMP la plus dorsale est issue de la subdivision du même PC qui donne naissance à la FC du DA2 (Boukhatmi *et al.*, 2012). Cependant, l'origine de la deuxième dIAMP n'est pas encore confirmée mais il est suggéré qu'elle puisse provenir de la division du progéniteur du muscle alaire (MA) de par l'expression transitoire de *zfh1* observée dans la cellule sœur du MA (Boukhatmi *et al.*, 2014). En ce qui concerne la dAMP, son origine est supposée mais n'a jamais été clairement identifiée. En effet, à l'origine les premières études avaient associé cette cellule au PC qui donne naissance à la FC du DA1 (Roy and Vijayraghavan 1999). Or, comme il l'a été montré plus tard, la subdivision du progéniteur du DA1 donne la FC du DA1 et un précurseur cardiaque. Désormais, dans la littérature, on la retrouve associée à la division du PC qui donnera la FC du DO1 (voir revues Dobi *et al.*, 2015 ; Bothe et Baylies, 2016). Même si cette hypothèse semble la plus probable car le destin de la

cellule sœur du DO1 reste inconnu, ce lignage n'a jamais été réellement investigué et reste encore à démontrer.

3. Gènes d'identité des AMPs :

De la même façon que leurs cellules sœurs les FCs, les AMPs peuvent aussi exprimer des gènes d'identités. Ainsi, la vAMP exprime le facteur de transcription S59 (Carmena *et al.*, 1995), alors que les deux lAMPs sont caractérisées par l'expression d'org-1 et ladybird (lb) (Jagla *et al.*, 1998 ; Schaub *et al.*, 2012). Il est intéressant de préciser que la lAMP antérieure possède aussi une expression transitoire du gène d'identité Krüppel (Figeac *et al.*, 2010). De son côté, la dlAMP dorsale maintient l'expression de Tup/Islet (Boukhatmi *et al.*, 2012). En ce qui concerne la deuxième dlAMP et la dAMP, aucun gène d'identité musculaire connu n'a été identifié comme exprimé dans ces cellules. Cette différence d'expression de gènes d'identités au sein des AMPs suggère un rôle de ces derniers pour conférer une identité distincte à chaque sous-population d'AMPs. Il a aussi pu être montré que les AMPs embryonnaires peuvent exprimer deux gènes d'identité, *vestigial* (*vg*) et *cut* (Williams *et al.*, 1990 ; Blochlinger *et al.*, 1988), normalement associés aux AMPs présentes au sein des disques imaginaux d'ailes et de pattes (Sudarsan *et al.*, 2001 ; Soler *et al.*, 2004). Ces deux facteurs de régulation sont exprimés dans l'ensemble des AMPs embryonnaires pour Cut (Figeac *et al.*, 2010), alors que Vg n'est exprimé que dans quelques AMPs thoraciques à partir du stade 12 (Sudarsan *et al.*, 2001).

4. AMPs et répresseurs myogéniques :

En parallèle, les AMPs possèdent de nombreux gènes caractéristiques leurs conférant une identité distincte de celles des FCs. Comme il l'a déjà été décrit précédemment ces cellules expriment fortement le facteur de transcription twist. Ce dernier, associé à la voie N, régule négativement la différenciation des AMPs (Anant *et al.*, 1998). Comme introduit précédemment, d'autres gènes connus pour inhiber le processus de myogénèse sont aussi retrouvés dans ces cellules : on distingue dans cette catégorie le facteur de transcription pléiotrope Zfh1 et le répresseur de Mef2 Hole in muscle (Him). Le rôle de Him dans les AMPs n'a pas encore été analysé en détail, mais son rôle de répresseur de Mef2 associé avec Zfh1 pourrait aider les AMPs à maintenir un état indifférencié jusqu'au début de la

métamorphose. En revanche, on sait que la mutation nulle de *zfh1* entraîne une perte ou un déplacement de certaines AMPs (Lai *et al.*, 1993). Il a aussi pu être démontré que Zfh1 possède une fonction antagoniste au facteur de transcription spécifique des FCMs *Lame duck* (*Lmd*) (Sellin *et al.*, 2009). En effet, dans un mutant nul pour *lmd* on observe l'apparition de cellules ectopiques de type « AMP-like ». Ces cellules provenant de la population des FCMs sont positives pour Twist, Zfh1 et Him montrant ainsi des caractéristiques propres aux AMPs. Cependant, ces cellules AMPs ectopiques ne peuvent pas récapituler une identité complètement identique aux AMPs endogènes. Ainsi, en région latérale ces cellules bien que localisées à proximité des IAMPs, sont incapables d'exprimer le gène d'identité *lb*. Il reste surprenant de voir des FCMs adopter un destin cellulaire proche des AMPs en cas de mutation de *lmd*. On peut aussi mentionner que des résultats similaires sur la formation de cellules «AMPs-like» ont aussi été obtenus en utilisant une surexpression pan-mésodermale (avec le pilote 24B-GAL4) du récepteur EGFR constitutivement actif ou du gène d'identité *Org-1* (Figeac *et al.*, 2010 ; Schaub *et al.*, 2012). Ensemble, ces expériences suggèrent que les AMPs possèdent bien une identité proche de celle des FCs, mais aussi une expression de gènes plus communs associés au maintien d'un état indifférencié des myoblastes.

5. La voie Notch dans les AMPs :

Un dernier acteur important dans l'identité des AMPs est l'activation de la voie N dans ces dernières. Un premier argument vient de l'impact de la voie Notch sur la division des PCs à l'origine des AMPs (Ruiz-Gomez et Bate, 1997). Ainsi, la surexpression de la forme constitutivement active du domaine intracellulaire du récepteur Notch dans le mésoderme (grâce au pilote Twist-GAL4) conduit à une augmentation du nombre de cellules Twist positives. A l'inverse, on observe une diminution du nombre d'AMPs dans les mutants pour l'inhibiteur de la voie N *numb*. Il a ensuite pu être démontré que les AMPs sont caractérisées par l'expression de deux rapporteurs connus de la voie N. Le premier est le gène *enhancer of split m6* (*E(spl)m6*). La dissection des régions activatrices de ce gène a permis d'établir que ce dernier est exprimé dans les AMPs dès le stade embryonnaire (Lai *et al.*, 2000) et est maintenu jusqu'à la fusion des AMPs au stade pupal (Bernard *et al.*, 2006). Il est important de mentionner que cette région activatrice est aujourd'hui l'un des deux seuls outils qui,

associé au GAL-4, permettent de cibler l'ensemble des AMPs au stade embryonnaire (Figeac *et al.*, 2010) ; le deuxième étant une région régulatrice du gène *Him* mais cette dernière présente l'inconvénient d'être exprimée dans l'ensemble du mésoderme aux stades précoces (Liotta *et al.*, 2007). L'autre rapporteur de la voie N exprimé dans les AMPs est le gène *big brain (bib)* (Doherty *et al.*, 1997). Le gène *bib* reste à ce jour un gène complexe à étudier. Il code pour une aquaporine (homologue de l'aquaporine-4 chez les vertébrés) mais ne posséderait pas d'activité aquaporine, et serait plutôt impliqué dans l'adhésion cellulaire (Tatsumi *et al.*, 2009). Ce gène est aussi étroitement associé à la voie N, et il est utilisé comme rapporteur de cette voie (de Celis *et al.*, 1998). Le gène *bib* a été identifié comme l'un des rares gènes provoquant un phénotype dit neurogénique (Lehmann *et al.*, 1983). Une étude plus approfondie a montré que parmi les gènes neurogéniques seul *bib* n'interagit pas génétiquement avec les autres (de la Concha *et al.*, 1988). De plus, il a été montré que la perte de *bib* agit sur le système nerveux périphérique (PNS) en augmentant le nombre de précurseurs neuronaux mais à un degré moindre que la mutation de *Notch* (Rao *et al.*, 1992). Son action comme gène neurogénique est donc plus faible, mais il conserve un effet sur la différenciation du mésoderme (Corbin *et al.*, 1991) comme les autres gènes neurogéniques.

6. Morphologie et comportement des AMPs

En étudiant le positionnement des AMPs au cours de l'embryogenèse, il a pu être montré que certaines de ces cellules possèdent une capacité migratoire (Bate *et al.*, 1991). En effet, la dIAMPs dorsale migre activement dorsalement vers la dAMP à partir du stade 14. D'une façon similaire, la IAMP antérieure se déplace elle aussi mais cette fois vers l'antérieur le long du muscle VL1 au cours du stade 15. Récemment l'utilisation d'un transgène M6-gapGFP permettant l'expression d'une forme membranaire de la GFP dans les AMPs a mis en évidence que ces cellules possèdent une activité filopodiale dynamique tout au long de l'embryogenèse (Aradhya *et al.*, 2015). Ces observations suggèrent que, bien que ces cellules soient décrites comme dans un état dormant, ces dernières montrent cependant une forte activité d'un point de vue comportemental dont le rôle sous-jacent reste encore à élucider.

7. Interactions entre les AMPs et le système nerveux :

Dès la première description des AMPs, les auteurs ont établi un lien entre leur position stéréotypée et celle du système nerveux périphérique moteur (Bate *et al.*, 1991). En effet, le co-marquage de ces deux tissus met en évidence une apparente association. Les dIAMPs se situent sur le trajet de l'ISN durant sa migration pour atteindre ces cibles musculaires dorsales au niveau de la dAMP. De plus, la branche latérale de la SNa se prolonge jusqu'à contacter le SBM au niveau des IAMPs, et la SNc est associée à la vAMP. D'une façon intéressante, peu après cette découverte le laboratoire de C. Goodman a proposé de considérer les AMPs comme des « points de contrôle » pour le système nerveux moteur (Vactor *et al.*, 1993). Cette hypothèse se base sur la position des AMPs par rapport à l'ISN et à la SN mais aussi sur la description d'un nouveau mutant présentant un phénotype d'arrêt de l'ISN au niveau de dIAMPs. Cependant, quelques années plus tard il a pu être montré que les allèles de ce mutant, alors appelé *stranded*, portent des mutations dans le gène *chickadee (profilin)* impliqué dans la régulation de la dynamique de l'actine (Wills *et al.*, 1999). Le phénotype observé est alors associé au rôle autonome de la Profilin dans les axones, et l'hypothèse d'un rôle des AMPs est abandonnée. En parallèle, il a pu être montré que les AMPs sont capables d'exprimer la protéine d'adhérence Fas2 pouvant laisser supposer un rôle de Fas2 dans les contacts AMPs/axones (Vactor *et al.*, 1993). De plus, cette expression de Fas2 par les AMPs est augmentée en cas d'absence de contact avec le système nerveux dans des embryons mutants pour *eve* (Landgraf *et al.*, 1999). Finalement, il a aussi été rapporté mais non publié que certaines AMPs sont capables d'exprimer précocement la protéine d'adhésion Connectin (Meadows *et al.*, 1994). Malgré toutes ces observations, une étude sur le rôle des FCs sur la formation des axones moteurs a établi que seules les FCs contribuent à la défasciculation des branches principales ISN et SN (Landgraf *et al.*, 1999). En utilisant une surexpression pan-mésodermale de la forme activée de N, la formation des FCs et des AMPs est quasiment abolie. Cependant, de rares événements de survie de FCs et/ou d'AMPs ont conduit à la conclusion que les AMPs ne seraient pas impliquées dans la défasciculation et la guidance de l'ISN et de la SN. Ces résultats ont mis un terme à l'hypothèse d'un éventuel rôle des AMPs sur le système nerveux.

Néanmoins, il est indéniable qu'il existe de fortes interactions entre AMPs et système nerveux. Non seulement ces derniers se contactent lors de l'embryogenèse, mais le système

nerveux est aussi utilisé comme support lors de la prolifération et de la migration de ces AMPs à partir du 2^{ème} stade larvaire (Currie et Bate, 1991). L'absence de système nerveux dans un segment induit une forte diminution du nombre de fibres musculaire dans ce même segment au stade adulte (Currie et Bate, 1995). Il est aussi important de noter qu'une étude récente sur l'expression des membres des familles Beat et Side en embryon a pu montrer que ces protéines possèdent un code et une hiérarchisation d'interactions entre elles (Li *et al.*, 2017). De plus, de nouveaux membres de la famille des Beats ont été retrouvés exprimés dans les MNs (par exemple Beat Va et Beat Vb dans les MNs de l'ISN), ainsi que certains membres de la famille des Sides qui sont eux exprimés dans les muscles ou dans les neurones sensoriels. Parmi ces derniers, il a été démontré que Side VI est exprimé dans une dIAMP. Cette découverte illustre non seulement la complexité relative à la guidance des axones mais surtout relance l'intérêt de l'étude des interactions entre AMPs et axones des MNs.

X. Objectifs de travail

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de thèse a été dans un premier temps d'analyser les relations entre les AMPs et les axones moteurs au cours de l'embryogenèse. Cette étude s'est principalement orientée sur le rôle potentiel des AMPs en tant que « points de contrôles » dans la guidance des axones. Afin de répondre à cette question, les analyses ont été concentrées sur l'effet des pertes ou des déplacements des AMPs sur la mise en place de l'innervation. Au cours de l'embryogenèse, ces AMPs ne sont pas uniquement des cellules dormantes mais elles sont aussi caractérisées par de nombreuses connexions avec leur environnement, ainsi qu'une dynamique morphologique et positionnelle. Les muscles constituent des partenaires majeurs pour les AMPs agissant sur leur survie en embryon et sur leur réactivation au stade larvaire. Une deuxième approche a donc porté sur les interactions entre les AMPs et leur niche musculaire. En parallèle, ce projet s'est aussi orienté sur l'approfondissement des connaissances sur les AMPs en se focalisant sur leur spécification, comportement et sur le rôle des marqueurs connus, ou mis en évidence au cours de cette étude, qu'elles expriment.

Résultats

I. Article 1 : *Drosophila* adult muscle precursor cells contribute to motor axons path-finding and proper innervation of embryonic muscles

Ce manuscrit sous forme de courte communication est en cours de préparation. Cette étude se concentre sur le rôle des AMPs dans la mise en place de l'innervation. Les résultats illustrent les interactions observées entre les AMPs et les cônes de croissance des axones moteurs via une forte dynamique filopodiale (Figure 1). Cet article s'attarde plus particulièrement sur l'importance des IAMPs dans la formation de la L-SNa (Figures 2 et 3). Il décrit aussi la mise en évidence de l'expression de Sidestep par les IAMPs, une molécule de guidance connue pour son rôle dans l'attraction des axones (Figure 4).

***Drosophila* adult muscle precursor cells contribute to motor axons path-finding and proper innervation of embryonic muscles**

Guillaume Lavergne and Krzysztof Jagla*
GReD - INSERM U1103, CNRS UMR6293, Clermont Université,
28, Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

* Corresponding author
christophe.jagla@uca.fr

Keywords: *Drosophila*, Adult muscle precursors (AMPs), Sidestep, SNa, guidance

Abstract

Adult Muscle Precursors (AMPs), the *Drosophila* muscle stem cells, originate from the embryonic mesoderm. They arise from the asymmetric cell divisions of a subset of muscle progenitors and occupy stereotyped positions in the vicinity of developing body wall muscles, which in larval stages play a role in AMPs reactivation. Strikingly, AMPs are also located in the path of intersegmental (ISN) and segmental (SN) motor neuron branches. However, their role and interactions with the motor neurons have not yet been analyzed in details. Here, using AMP sensor line revealing cell membrane extensions we show that the navigating ISN first contacts the dorso-lateral AMPs and then the dorsal AMP marking the end of its navigation. In parallel, the segmental SNa nerve innervating lateral muscles targets the lateral AMPs (L-AMPs). In vivo analyses of AMPs behavior highlight an active filopodial dynamic of AMPs toward the ISN and SNa suggesting they could guide motor axons and contribute to muscle innervations. Indeed, our data show that loss or mispositioning of L-AMPs affect the SNa motor axons pathfinding and branching, leading to loss or aberrant muscle innervation. The finding of a transient expression of the guidance molecule Sidestep in L-AMPs suggests its implication in this process. Our study highlight that the complex process leading to muscle innervation do not only rely on the dialogue between the muscles and the peripheral nervous system, but also on the *Drosophila* muscle stem cells. AMPs represent spatial landmarks for navigating motor neurons and their positioning appears critical for the innervation of the muscles in the lateral region.

Introduction

Drosophila embryonic muscle stem cells, called adult muscle precursors (AMPs), arise from the asymmetric divisions of a subset of muscle progenitor cells and are siblings of embryonic muscle founders (Carmena *et al.*, 1995). AMPs stay quiescent and undifferentiated during the embryonic life and get reactivated during second larval instar (Aradhya *et al.*, 2015) to generate muscles of the adult fly. They occupy stereotyped positions within embryonic abdominal segments and are characterized by the persistent expression of the myogenic transcription factor Twist (Bate *et al.*, 1991) and activation of the Notch pathway (Figeac *et al.*, 2010). We can distinguish 6 AMPs per abdominal hemisegment in ventral (V-AMP), lateral (L-AMPs), dorso-lateral (DL-AMPs) and dorsal (D-AMPs) positions. Strikingly, AMPs are situated in the path of some motor neuron axons (Bate *et al.*, 1991). During mid-embryogenesis, in each hemisegment, 6 peripheral nerve branches exit the central nervous system, navigate guided by attractive and repulsive cues from the surrounding tissues and ensure innervation of body wall muscles. The two main branches, the intersegmental nerve (ISN) and the segmental nerve a (SNa), were suggested to use the AMPs as checkpoints during their navigation within the muscle field (van Vactor *et al.*, 1993). However, despite this hypothesis made decades ago, the relationship between motor axons and AMPs is still unknown and remains to be elucidated. Here, we report that the AMPs, actively contribute to the motor axons path-finding and branching during embryogenesis. Using AMP-gapGFP cell sensor that allows following *in vivo* behavior of AMPs, we demonstrate that L-AMPs attract navigating SNa motor axons, establish contact and induce the lateral SNa sub-branching. Importantly, genetically induced L-AMPs ablation leads to the loss of the lateral SNa branch and consequently to the loss of SBM muscle innervation. The capacity of L-AMPs to transiently express the attractant molecule Sidestep supports the view that they could interact with the navigating Beat-positive SNa. This so far unexplored role of embryonic AMPs could improve our understanding of how selective muscle innervation is regulated.

Results and discussion

AMPs actively interact with the motor axons

As it has been described when AMP cells were identified, the two main branches of the motor axons the ISN and SN are contacting the AMPs (Bate *et al* 1991). Here, we tested when these contacts occur during development. We observed that the ISN establishes contacts with the DL-AMPs during stage 13 and then navigates toward the D-AMP (Fig. **1A-A''**). The SNa is sub-divided in two branches, the dorsal, which innervates the lateral muscles (LTs 1-4) and the lateral branch (L-SNa), which will migrate towards the L-AMPs during stage 15 prior to targeting the Segmental Border Muscle (SBM). To better characterize AMP cells behavior we performed time-lapse experiments on embryos carrying M6-gapGFP transgene that allows the visualization of the membrane of AMP cells. Consistent with the previous report (Aradhya *et al.*, 2015) we found that all AMPs actively sense the environment and display highly dynamic filopodial behavior. Moreover, the anterior L-AMP and one of the DL-AMPs both undergo directional migration towards adjacent motor axon branches (Fig. **1**). Importantly, the migratory behavior of AMPs and particularly of L-AMPs is not disrupted in the absence of motor axons as shown in the *prospero* mutant (Fig. **S1** and Broadie and Bate, 1993). These observations prompted us to test whether the AMPs could be required for the proper navigation of motor axons. By using M6-Gal4 driven UAS-Life-actin GFP reporter line we were able to visualize both the motor axons and the AMPs (Fig. **1E-L**). Live imaging revealed that among the numerous oriented cytoplasmic projections sent by the AMPs; those contacting the growth cones of motor axons get stabilized (Fig. **1F,G,J**). In particular, stabilization of filopodial connections between L-AMPs and SNa coincides with the setting of SNa branching point and specification of its lateral branch (Fig. **1E-H** ; movie **S1**). Oriented filopodial dynamic of AMPs is also observed in the dorsal region preceding the contact between D-AMP and migrating dorsally ISN growth cone prior to ISN migration toward the D-AMP (Fig. **1I-L** ; movie **S2**). Thus AMPs actively interact with the navigating motor axons suggesting they could represent spatial check-points for motor axons migration and/or branching.

L-AMPs are required for the lateral sub-branching of the SNa

In order to test impact of L-AMPs on the SNa trajectory and branching, we first assessed the effect of a genetic ablation of the AMP cells by using the M6-Gal4-driven expression of a pro-apoptotic gene *reaper*. This has led to targeted induction of apoptosis selectively in AMPs with occasional AMP cell loss and without noticeable defects in motor neuron network in which M6-Gal4 is also expressed. This differential effect could be due to a lower expression level of M6-Gal4 in motor neurons compared to AMPs. Importantly, the loss of L-AMPs was associated with an absence of lateral branch of SNa (L-SNa) in 84% of hemisegments (n=36) (Fig. **2E-H,N**), strongly suggesting that L-AMPs play an instructive role in L-SNa formation and/or stabilization. M6-Gal4 induced apoptosis led to a context in which loss of L-SNa branch was observed in L-AMP-devoid segments where the L-SNa-target muscle (the SBM) was still present (Fig. **2E-H,N**). This suggested that L-SNa branch formation might not be dependent on its muscle target and prompted us to test whether the L-SNa form in the SBM-lacking context. To do so we targeted *reaper* expression to the developing SBM using previously described SBM-Gal4 driver (Figeac *et al.*, 2010). The SBM-Gal4-driven apoptosis resulted in a systematic loss of the SBM with no major impact on the L-AMPs. In such a SBM-devoid context but with L-AMPs cells correctly located, the L-SNa branch formed normally (Fig. **2I-L,O**). In contrast, in a subset of SBM-deficient embryos L-AMPs mis-placement towards the navigating SNa resulted in shortening of the L-SNa. Thus, these observations came in support of an instructive role of AMPs in L-SNa sub-branching revealing that SBM is dispensable for this process. To further test the role of L-

AMPs in lateral sub-branching of the SNa we analyzed different mutant contexts in which AMPs specification is affected. We first induced perturbation of asymmetric cell divisions. To affect divisions of progenitor cells that give rise to AMPs we ectopically expressed the asymmetry determinant Numb using the pan-mesodermal driver Twist-Gal4 (Ruiz-Gomez *et al.*, 1997). In the lateral region, this has led predominantly to the loss of one of the L-AMPs and a duplication of the SBM. However, in a small subset of embryos we observed loss of both the L-AMPs without affecting the presence of the SBM (often duplicated) (Fig. 3B-B''). In such a context, the L-SNa was absent in 100% of hemisegments (n=10) (Fig. 3B-B'') very much like after inducing L-AMPs apoptosis. These data are also consistent with the effects of generalized mesodermal expression of the identity gene *Pox meso*, which leads to a partial loss of L-AMPs (Duan *et al.*, 2007), and in consequence affects lateral SNa sub-branching in L-AMPs-devoid segments (Fig. 3C-C''). Interestingly, pan-mesodermal expression of *Pox meso* can also induce misplacement of L-AMPs along the SBM (Fig. 3C-C''). They move dorsally and influence L-SNa trajectory (Fig. 3C-C''). Hence, these data show that L-AMPs and their spatial positioning are critical to achieve the sub-branching and correct trajectory of the L-SNa.

AMPs express the involved in motor axon guidance sidestep

Presented above data suggest that L-AMPs are source of attractive signals that promote lateral sub-branching of dorsally migrating SNa. In particular, this could help in defining cellular and molecular processes underlying motor axon targeting of the SBM muscle that is innervated by the lateral SNa branch. Interestingly, the SBM is the only lateral muscle innervated by the Connectin-positive SNa, which does not express this homophilic target recognition molecule (Nose *et al.* 1992; Nose *et al.* 1997). In such a context L-AMP-mediated lateral sub-branching of SNa represents a way to drive L-SNa to its specific muscle target. Since L-AMPs, seem not to express Connectin either (Fig. S2), their role in attracting SNa and inducing the L-SNa sub-branching might rely on other specific guidance molecules in addition to their active filopodial dynamics facilitating cell-cell contacts.

To identify candidate molecules that could act in L-SNa attraction we first checked whether the L-SNa loss has already been described. It turns out that among the rare mutants showing a loss of L-SNa, the mutants of *sidestep* and *beat-1a*, encoding interacting partner membrane proteins of the Immunoglobulin superfamily, displayed a phenotype highly similar to the one observed when L-AMPs are missing (Fambrough et Goodman 1996 ; Sink *et al.*, 2001). However, the mechanisms leading to the loss of the L-SNa in *sidestep* and *beat-1a* mutants remain to be elucidated. Also, the embryonic expression pattern of *sidestep* has been only partially characterized (Sink *et al.*, 2001; Siebert *et al.*, 2009) so that we decided to test Sidestep protein distribution at the time when L-SNa sub-branching is taking place. When examining stage 14 to 16 embryos we found a previously unreported faint and transient expression of Sidestep specifically in L-AMPs (Fig. 4A-A''). In order to confirm this observation we analyzed the expression of Sidestep in a mutant for *beat-1a*. It has been reported (Siebert *et al.*, 2009) that the contact of Beat-1a expressing motor axons with Sidestep expressing cells leads to a negative regulation of the expression of *sidestep*. If this contact is missing, cells normally expressing *sidestep* transiently and at a low level will continue to do so leading to a higher Sidestep level in these cells. Analyses of *beat-1a* mutants confirmed that the L-AMPs are Sidestep expressing cells and that the Sidestep expression onset coincides with the L-SNa sub-branching (Fig. 4B-C'). An increase in Sidestep expression resulting from the lack of *beat-1a* was still detected in late stage embryos in which it becomes gradually restricted to the most anterior L-AMPs (Fig. 4D,D'). This late differential Sidestep expression might highlight the leading role of the anterior L-AMPs in the

process of interaction with SNa and in its lateral sub-branching. Importantly, the SBM is not expressing Sidestep, making the L-AMPs the only Sidestep expressing cells in the L-SNa path. Interestingly, the *sidestep* mutants also display stall phenotype of the ISN (Sink *et al.*, 2001), which could have suggested a potential role of the D-AMPs. However, we were unable to detect Sidestep expression in D-AMPs both in control and in *beat* mutant embryos, indicating that other guiding cues could be in play. Indeed, the aberrantly located D-AMPs are able to shift the ISN trajectory suggesting they are source of attracting signals (Fig. S3). Thus, both D-AMPs and L-AMPs are able to attract navigating motor axons and influence their trajectory. However, loss of D-AMPs does not affect the capacity of ISN motor axons to target dorsal muscles. Moreover, the Sidestep expressing L-AMPs are required for lateral sub-branching of navigating Beat-1a positive SNa and consequently for the innervation of L-SNa targeted SBM.

It is also important to mention that the loss of L-SNa in the *sidestep* mutants is not fully penetrant suggesting that *sidestep* is not the only player in the L-SNa sub-branching. This could be due to functional redundancy between several members of Side and Beat families comprising 8 and 14 members, respectively (Li *et al.*, 2017). Expression and function of Side and Beat family members remain largely unexplored but the fact that Sidestep labels L-AMPs and its paralog *side VI*, is expressed in the DL-AMPs (Li *et al.*, 2017) allow to speculate that there is a “side expression code” that operates in AMPs and makes them competent to interact with navigating motor axons.

The role of L-AMPs on SNa trajectory and sub-branching suggests a potential role of other AMPs in guiding motor axons. A more general role of AMPs in setting motor axons trajectory is also supported by the described previously (Layden *et al* 2006) partial rescue of *zfh1* motor neuron phenotype after re-expressing *zfh1* in the nervous system. Considering that AMPs are Zfh1 positive cells and that *zfh1* contributes to the AMPs specification (Lai *et al.*, 1993) could imply that the innervation phenotype observed in *zfh1* mutants is due to both neural and AMP-related, function of *zfh1*.

Finally, the fact that AMPs are closely associated with the motor axons network suggests that this interaction could also play an important role for the AMPs during their quiescent state. Further exploring of cellular and molecular mechanisms underlying interconnections between AMPs and motor axons might shed a new light on our understanding of both axons navigation and AMPs homeostasis.

Material and methods:

Drosophila stocks

Drosophila stocks were maintained at 25°C. The M6-gapGFP (Aradhya *et al.*, 2015) strain was used as control. Mutant strains used were *prosp*¹⁷(BL5458), *beat*^{C163}(BL4742) and *beat*³(BL4748). The targeted expression experiments were performed using the UAS-GAL4 system (Brand and Perrimon, 1993) on the following GAL4 and UAS lines: M6-GAL4 and SBM-GAL4 (generated in the lab); Twist-GAL4 (kindly provided by M. Frasch); UAS-Poxm (kindly provided by M. Noll); UAS-Numb (FlyORF:F003181); UAS-Reaper (BL5824), UAS-LifeActGFP (BL58718) from Bloomington Stock Center. Mutant strains were balanced with CyO ActinGFP and TM6B KrGFP, homozygous mutant embryos were selected by absence of corresponding GFP staining. All Gal4-UAS crosses were performed at 25°C.

Immunohistochemical staining and live imaging

Staged embryos were dechorionated, fixed, blocked for 1 h at room temperature in 20% horse serum in PBT and then incubated with primary and secondary antibodies according to a standard procedure (Lavergne *et al.*, 2017). The primary antibodies used were: goat anti-GFP (1:500, Abcam, ab 5450), guinea-pig anti-Twi (1:1000, kindly provided by R. Zinzen), rabbit anti- β 3Tubulin (1:2000, kindly provided by R. Renkawitz-Pohl; Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany); mouse anti-Fas2 (1D4; 1:400), mouse anti-Con (C1.427; 1:50), mouse anti-Side (9B8; 1:50) from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa). Secondary antibodies were: donkey anti-rabbit, donkey anti-guinea pig, donkey anti-goat and donkey anti-mouse (Jackson Immuno Research Laboratories) conjugated to Alexa 488, CY3 or CY5 fluorochromes (dilution 1:300). Labeled embryos were analyzed using an SP8 (Leica) confocal microscope equipped with HyD detector, with a 40X objective. Images were processed with ImageJ.

In vivo imaging of M6>LifeActGFP embryos was performed from stage 14 to 16 over 2 hours. Films were acquired on a Leica SP8 confocal microscope and analysed using Imaris software (Bitplane).

Figure legends

Figure 1. AMPs actively interact with the motor axons. (A-B'') Lateral view of a stage 13 (A-A'') or stage 15 (B-B'') M6-gapGFP embryos showing the embryonic pattern of motor axons (stained with anti-Fas2) and AMPs (revealed with M6-GapGFP) associated with muscles (marked by anti- β -Tubulin). Arrowheads in A-A'' indicate an example of contact between DL-AMPs and the growing ISN. In B-B'', arrowheads and white arrows point respectively toward the contact establishment between SNa/L-AMPs and ISN/D-AMPs. (C,D) Scheme representing muscle pattern (grey), the AMPs (red) and the two major nervous branches ISN (deep blue) and SNa (light blue) within an abdominal hemisegment. (E-L) Selected time-points from supplemental movies 1 and 2, showing *in vivo* lateral view (E-H) or dorsal view (I-L) of M6-Gal4>LifeactinGFP stage 15 embryos. The white arrows mark the first contacts between filopodia from SNa and L-AMPs (F,G) or a D-AMP and the ISN (J).

Movies S1 and S2. Live imaging of AMPs and motor axons contact establishment. *In vivo* lateral view (movie S1) or dorsal view (movie S2) of M6-Gal4>LifeactinGFP stage 15 embryos during 2 hours of development. during 2 hours of development.

Figure S1 : Motor axons are not necessary for AMPs behavior. Dorsal view (A-D) and lateral view (E-H) of stage 16 *prospero* mutants. In this context motor axons do not exit the CNS properly leaving only minor extension toward the most ventral muscles (G,H), and the Fas2 positive extension of the LBD in the dorsal region (C,D). Arrowheads points toward the unaffected migration of DL-AMPs (B,D) and L-AMPs (F,H).

Figure 2 : Effects of AMP-targeted apoptosis on the lateral SNa branching and SBM innervation. (A-L) Zoomed lateral view of a stage 16 M6-gapGFP as a control (A-D); M6-gapGFP;SBM-GAL4>Reaper (E-H) and M6-gapGFP;M6-GAL4>Reaper (I-L) embryos. Complete absence or ongoing apoptosis of the SBM are shown with white asterisks. (E-H) Apoptosis of SBM muscle is marked by white asterisk. Persistence of the L-SNa can be observed (white arrows) in contact with remnant L-AMP even when the SBM is missing. (I-L) Apoptosis of L-AMPs is observed in one hemisegment with mispositioned apoptotic body marked by a white asterisk. The same hemi-segment also displays a loss of L-SNa (white arrow). (M-O) Results are illustrated by recapitulative schemes with muscles in grey, AMPs in red and SNa in blue.

Figure 3 : Specification of L-AMPs is required for the formation of the L-SNa. Zoomed lateral view of either Twist-GAL4 (A-A''), Twist-Gal4>Numb (B-B'') or Twist-Gal4>Pox meso (C-C'') stage 16 embryos. Ectopic expression of numb and pox meso in the mesoderm is sufficient to affect the specification of AMPs. Absence of L-AMPs in a given hemisegment is marked with white asterisks (B',B'',C',C''). Segments lacking L-AMPs also present an absence of L-SNa indicated with a white arrow (B-C''). (C-C'') White arrowheads points toward dorsally mis-positioned L-AMPs and the resulting L-SNa stabilized at a more dorsal position than in control segments.

Figure S2 : L-AMPs do not express the cell adherence molecule Connectin. Ventro-lateral view of stage 13 (A-D) and stage 16 (E-H) M6-gapGFP embryos stained with anti-Connectin. Connectin expression is observed in lateral and ventral acute muscles as well as in some cells in the CNS. AMPs are Connectin negative.

Figure 4 : L-AMPs express transiently the guidance molecule Sidestep.(A-A'') Zoomed lateral view of a M6-gapGFP stage 15 embryo. Immunostaining with the anti-Sidestep antibody reveals a weak expression in L-AMPs (white arrows). (B-D'') In *beat-1a* mutant embryo Sidestep expression appears activated in Sidestep-positive cells, starting from stage 13 except for L-AMPs, which are Sidestep negative at this stage. (B,B') Increased Sidestep expression in L-AMPs could be detected at stage 15 (C,C') and persists in the anterior L-AMP in stage 16 *beat-1a* mutant embryos (D,D').

Figure S3 : ISN dorsal migration is not affected by the absence of the D-AMP. (A-D) Zoomed dorsal view of Twist-Gal4>Pox meso stage 16 embryo. The ectopic expression of pox meso can induce either the loss of D-AMPs (white asterisk) or their duplication in a given segment (white arrows). The absence of the D-AMPs does not lead to a stall phenotype for the ISN, which can still innervate the most dorsal muscles. In the segment with duplicated D-AMPs both retain the ability to attract the ISN.

References

- Aradhya, R., Zmojdian, M., Da Ponte, J.P., and Jagla, K. (2015). Muscle niche-driven Insulin-Notch-Myc cascade reactivates dormant Adult Muscle Precursors in *Drosophila*. *Elife* 4.
- Bate, M., and Rushton, E. (1993). Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 316, 1047–1061.
- Bate, M., Rushton, E., and Currie, D.A. (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113, 79–89.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Broadie, K., and Bate, M. (1993). Muscle development is independent of innervation during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 119, 533–543.
- Carmena, A., Bate, M., and Jiménez, F. (1995). Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* 9, 2373–2383.
- Currie, D.A., and Bate, M. (1991). The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* 113, 91–102.
- Duan, H., Zhang, C., Chen, J., Sink, H., Frei, E., and Noll, M. (2007). A key role of Pox meso in somatic myogenesis of *Drosophila*. *Development* 134, 3985–3997.
- Fambrough, D., and Goodman, C.S. (1996). The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* 87, 1049–1058.

Figeac, N., Jagla, T., Aradhya, R., Da Ponte, J.P., and Jagla, K. (2010). *Drosophila* adult muscle precursors form a network of interconnected cells and are specified by the rhomboid-triggered EGF pathway. *Development* *137*, 1965–1973.

Lai, Z.C., Rushton, E., Bate, M., and Rubin, G.M. (1993). Loss of function of the *Drosophila* *zfh-1* gene results in abnormal development of mesodermally derived tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 4122–4126.

Lavergne, G., Soler, C., Zmojdzian, M., and Jagla, K. (2017). Characterization of *Drosophila* Muscle Stem Cell-Like Adult Muscle Precursors. *Methods Mol. Biol.* *1556*, 103–116.

Layden, M.J., Odden, J.P., Schmid, A., Garces, A., Thor, S., and Doe, C.Q. (2006). *Zfh1*, a somatic motor neuron transcription factor, regulates axon exit from the CNS. *Dev. Biol.* *291*, 253–263.

Li, H., Watson, A., Olechwier, A., Anaya, M., Sorooshyari, S.K., Harnett, D.P., Lee, H.-K.P., Vielmetter, J., Fares, M.A., Garcia, K.C., *et al.* (2017). Deconstruction of the beaten Path-Sidestep interaction network provides insights into neuromuscular system development. *Elife* *6*.

Nose, A., Mahajan, V.B., and Goodman, C.S. (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* *70*, 553–567.

Nose, A., Umeda, T., and Takeichi, M. (1997). Neuromuscular target recognition by a homophilic interaction of connectin cell adhesion molecules in *Drosophila*. *Development* *124*, 1433–1441.

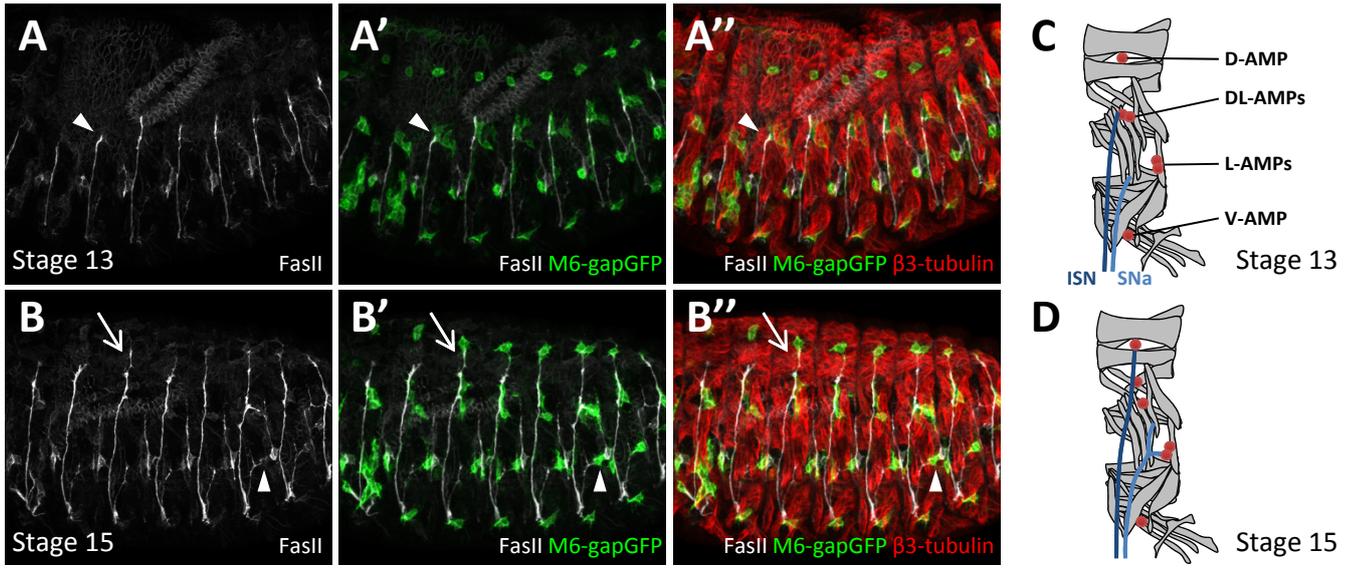
Ruiz Gómez, M., and Bate, M. (1997). Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires *numb*. *Development* *124*, 4857–4866.

Sarkissian, T., Arya, R., Gyonjyan, S., Taylor, B., and White, K. (2016). Cell death regulates muscle fiber number. *Dev. Biol.* *415*, 87–97.

Siebert, M., Banovic, D., Goellner, B., and Aberle, H. (2009). *Drosophila* motor axons recognize and follow a Sidestep-labeled substrate pathway to reach their target fields. *Genes Dev.* *23*, 1052–1062.

Sink, H., Rehm, E.J., Richstone, L., Bulls, Y.M., and Goodman, C.S. (2001). *sidestep* encodes a target-derived attractant essential for motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* *105*, 57–67.

Vactor, D.V., Sink, H., Fambrough, D., Tsou, R., and Goodman, C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* *73*, 1137–1153.



M6>LifeactinGFP live imaging

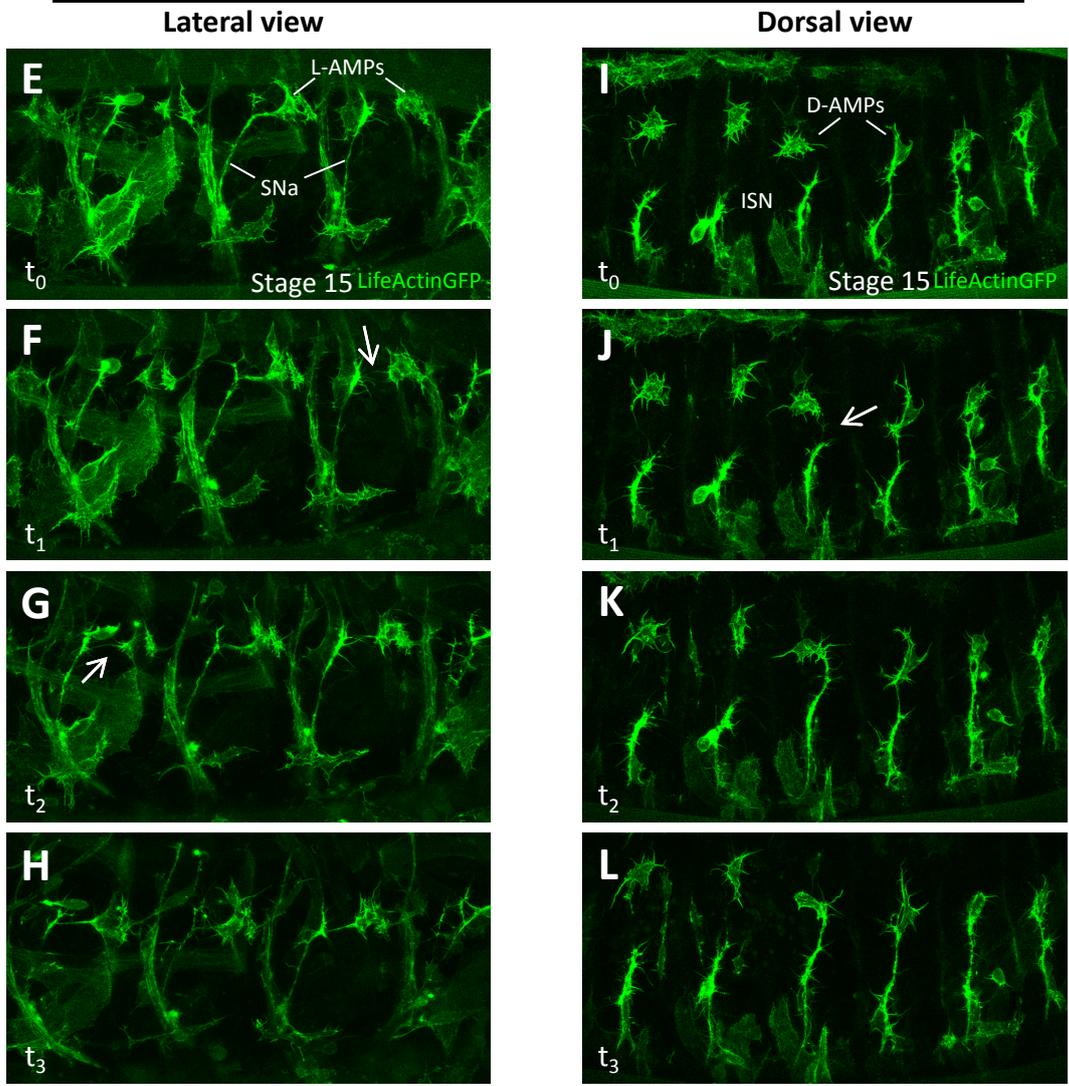


Figure 1: AMPs actively interact with the motor axons

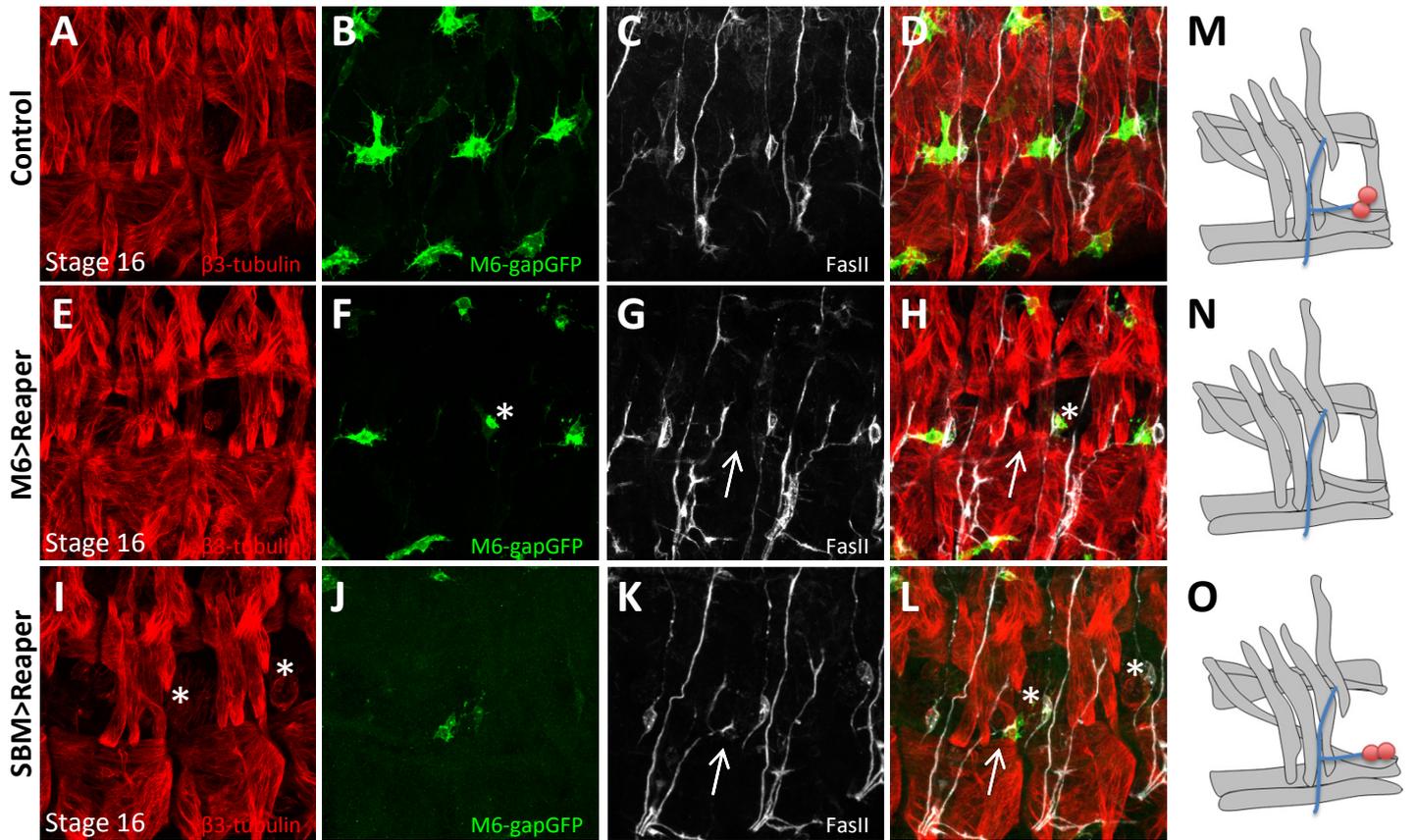


Figure 2: Effects of AMP-targeted apoptosis on the lateral SNa branching and SBM innervation.

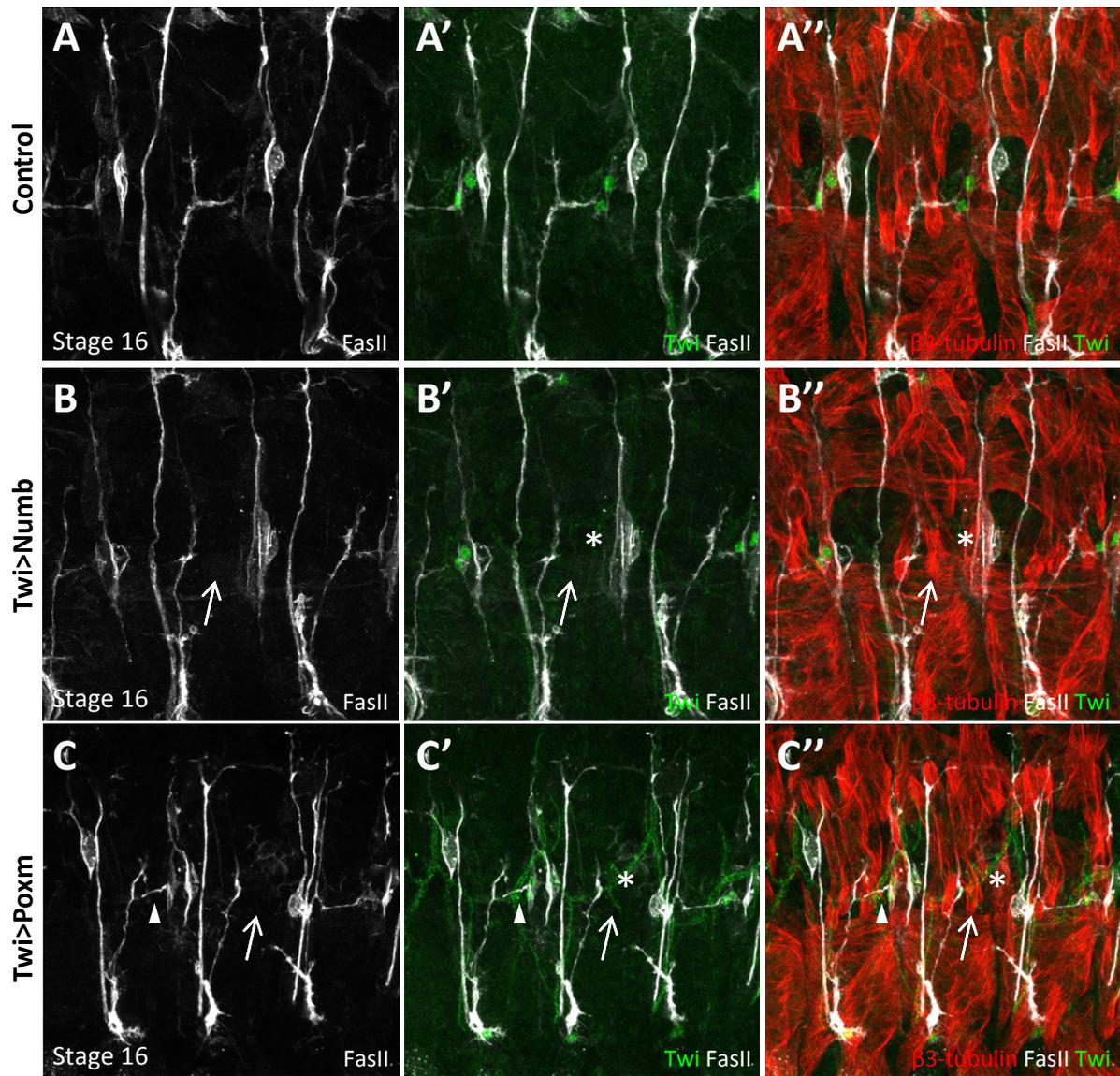


Figure 3: Specification of L-AMPs is required for the formation of the L-SNAs.

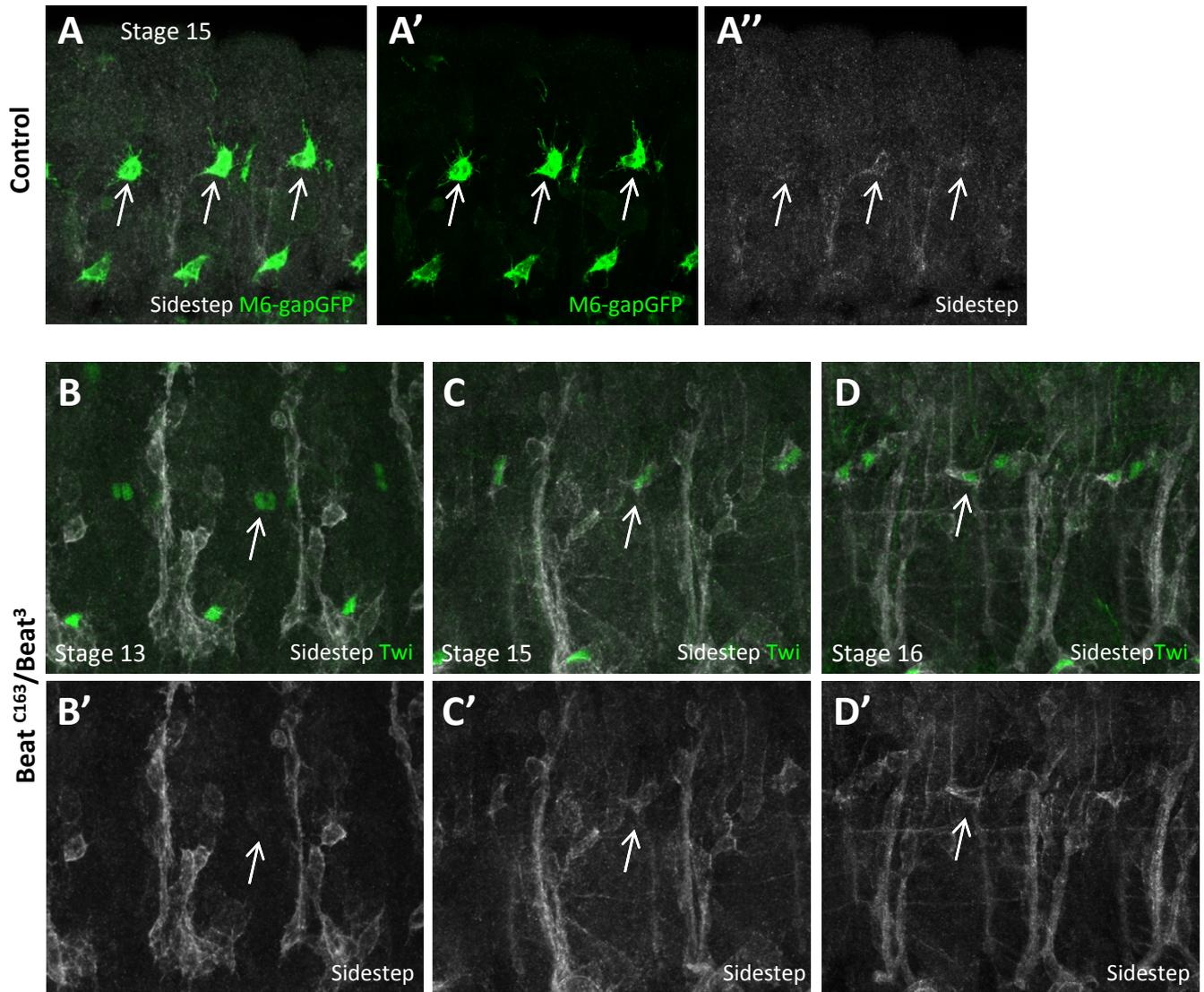


Figure 4: L-AMPs express transiently the guidance molecule Sidestep

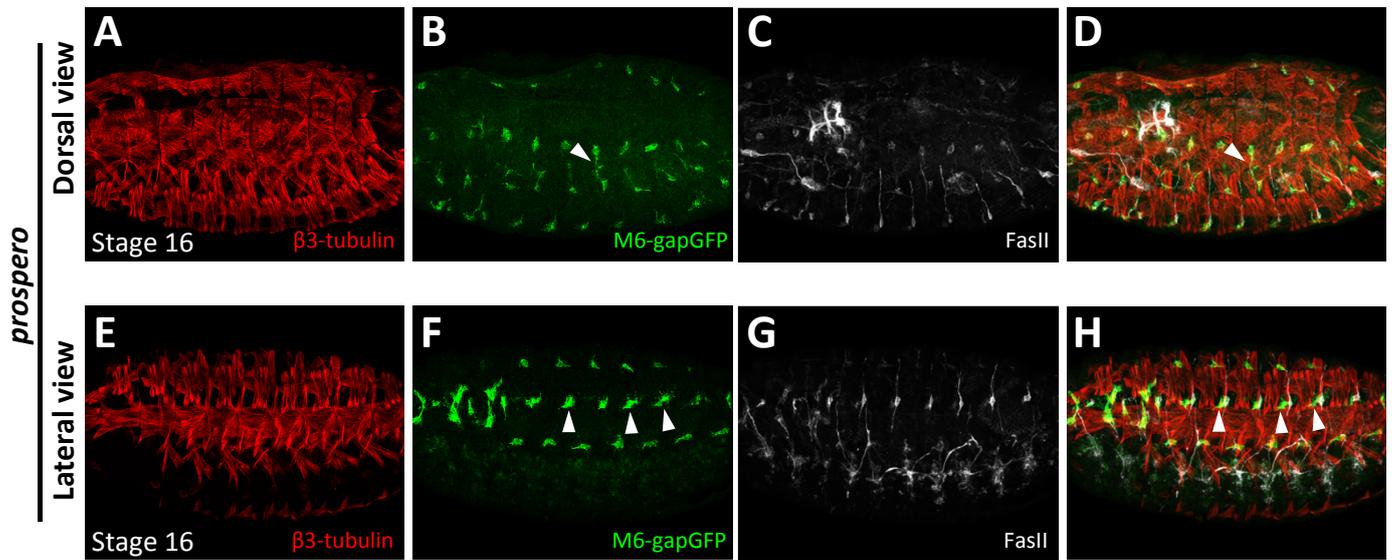


Figure S1: Motor axons are not necessary for AMPs behavior

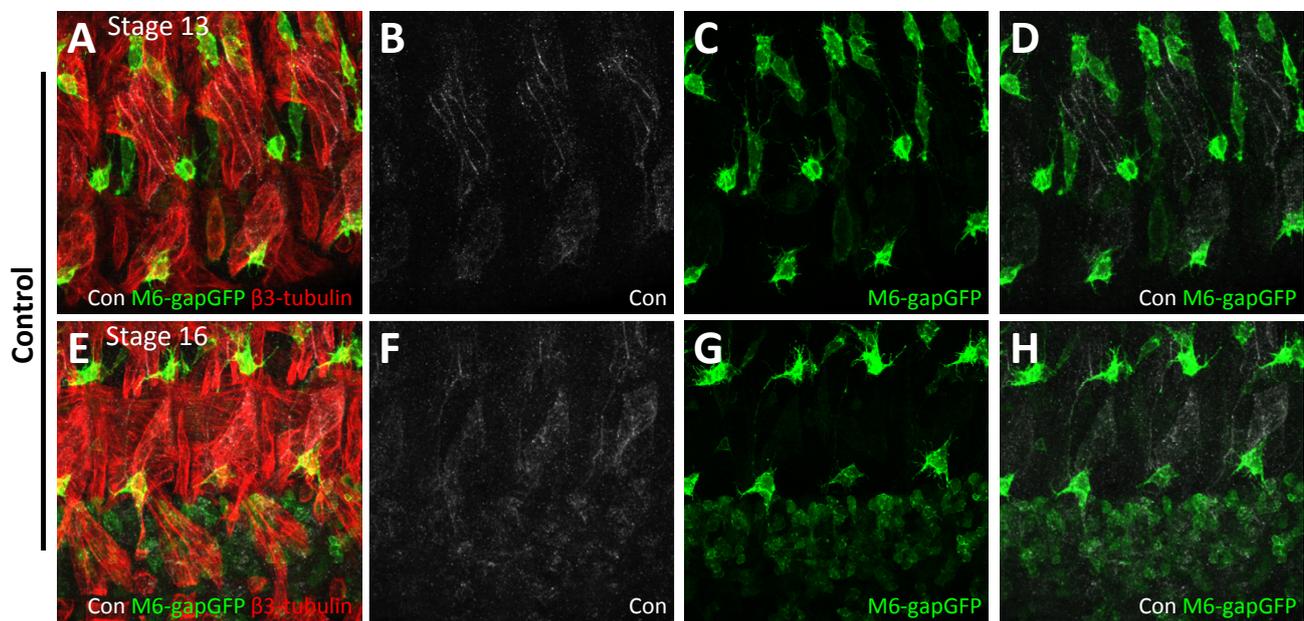


Figure S2: L-AMPs do not express the cell adhesion molecule Connectin

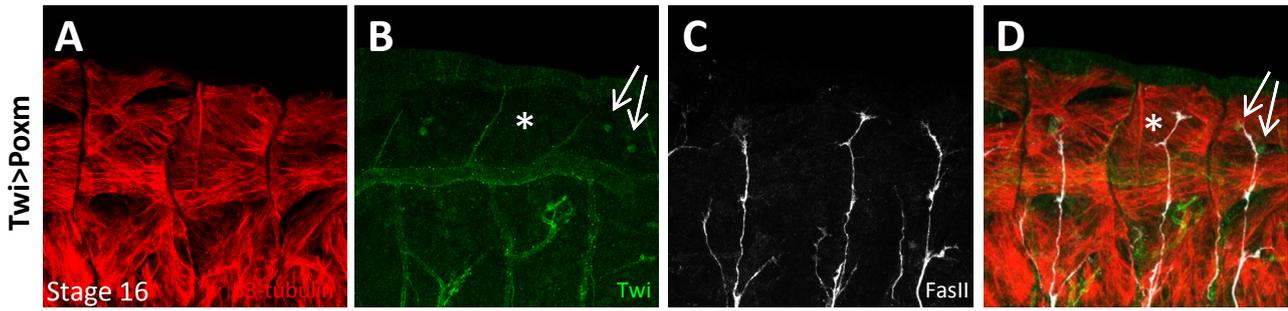


Figure S3: ISN dorsal migration is not affected by the absence of the D-AMP

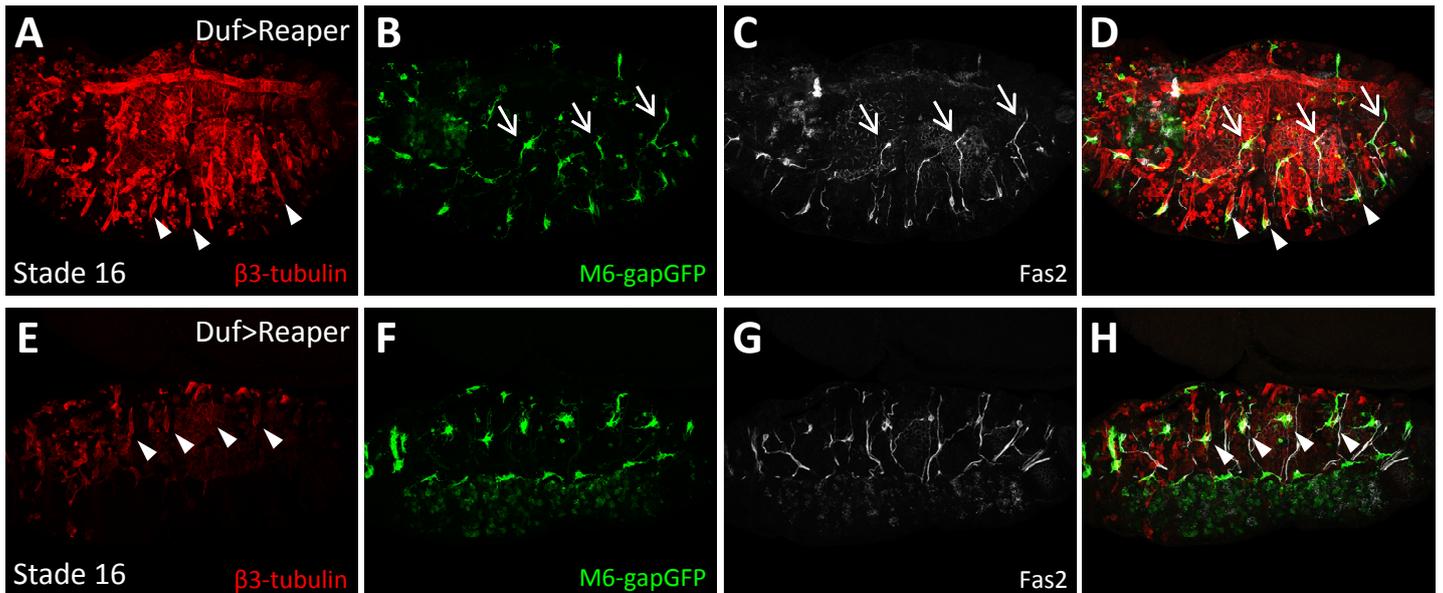


Figure 15: AMPs et axones moteurs restent associés en l'absence des muscles

Vues dorso-latérale (A-D) et ventro-latérale (E-H) d'embryons de stade 16 M6-gapGFP;Duf>Reaper. Les muscles sont révélés par un marquage contre la $\beta 3$ -tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). Les parois musculaires sont absentes même si on peut observer la persistance de certains muscles dont les muscles SBM (têtes de flèches blanches). Les vAMPs et les IAMPs ne sont pas affectées par la perte des muscles. Pour les AMPs de la région dorsale, les AMPs survivantes sont associées aux axones moteurs (Flèches blanches).

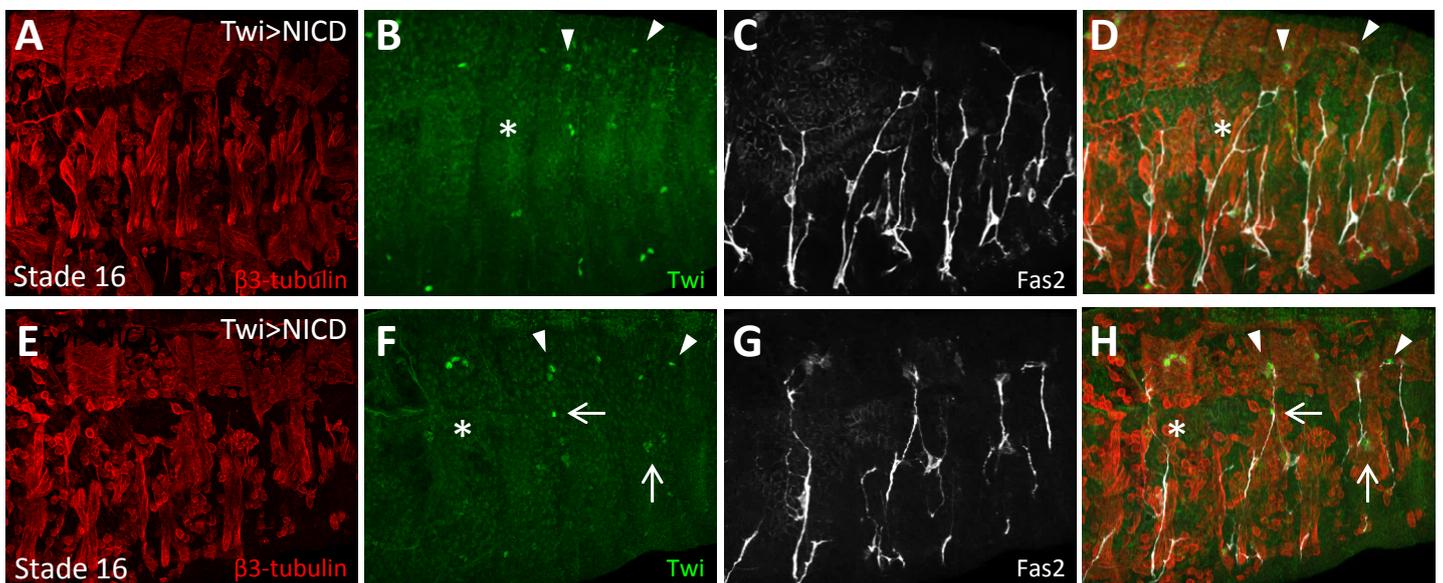


Figure 16: La délocalisation des AMPs de la région dorsale affecte le trajet de l'ISN

Vues dorso-latérales zoomées d'embryons Twi>NICD de stade 16. Les muscles sont révélés par un marquage contre la $\beta 3$ -tubulin (en rouge), les AMPs par des anticorps anti-Twi (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). L'effet stochastique de l'absence de formation des cellules fondatrices et des AMPs est illustré par deux embryons différents (A-D et E-H). Bien que les positions des dAMPs (têtes de flèches blanches) et des dIAMPs (flèches blanches) soient perturbées, l'ISN entre toujours en contact avec elles. L'absence de dIAMPs dans un segment donné ne bloque pas la migration de l'ISN (astérisques blancs).

II. Dissection du rôle des AMPs sur la mise en place de l'innervation :

Afin d'établir une première relation entre les AMPs et le système nerveux moteur, deux expériences différentes ont été réalisées. En effet, bien que les muscles soient fortement impliqués dans la défasciculation et l'attraction des axones, le rôle potentiel des AMPs dans la guidance des axones n'est pas évident à déterminer. Les AMPs étant les cellules sœurs des FCs, dans de nombreux cas affecter la formation de l'un revient à affecter l'autre.

Pour contourner cette difficulté et pouvoir distinguer un éventuel rôle des AMPs, une première expérience consistant à induire l'apoptose de l'ensemble de la paroi musculaire via le pilote Duf-GAL4 a été menée (Figure 15). Pour cela le pilote Duf-GAL4, spécifique des FCs et des fibres musculaires, a été associé à l'expression du gène pro-apoptotique *reaper*. Le pilote Duf-GAL4 présente l'avantage de ne pas être exprimé dans les AMPs. Mais induire l'apoptose des muscles peut entraîner l'apoptose des AMPs, soulignant le rôle des muscles dans la survie des AMPs embryonnaires (Aradhya *et al.*, 2015). Les embryons issus de ce croisement présentent souvent une disparition presque complète de l'ensemble des muscles. Au sein de cette paroi déstructurée, on observe dans la région dorsale la présence de quelques cellules AMPs qui ont pu survivre. Ces cellules AMPs sont la plupart du temps retrouvées associées avec ce qui reste du système nerveux moteur. Les dAMPs et/ou dlAMPs encore présentes marquent l'extension terminale de l'ISN en absence de muscles. Étonnamment, les vAMPs sont particulièrement résistantes à la perte complète des muscles avoisinants. Dans un embryon dépourvu de muscles ventraux, les vAMPs occupent une position normale tout en restant connectées au système nerveux moteur par une branche SNc tronquée. Dans la région latérale, les lAMPs ne sont que peu perturbées mais ceci est corrélé avec la persistance du SBM et de la branche SNa. Cette conservation du SBM peut s'expliquer par l'expression légèrement plus faible du pilote Duf-GAL4 dans le SBM (observation personnelle). Cette résistance peut aussi être une conséquence du fait que le SBM est un des rares muscles qui présente une résistance à l'histolyse des muscles au cours de la métamorphose, elle aussi reposant sur l'apoptose. Cependant, ce type d'expérience présente le désavantage de ne pas pouvoir distinguer si les muscles ont été affectés avant ou après un éventuel contact avec les axones moteurs. Il est donc difficile de conclure sur l'effet des AMPs sur la guidance des axones. Il reste malgré tout intéressant de voir que la position des AMPs restantes est étroitement liée aux axones des MNs. Cette observation suggère que

la survie de ces cellules AMPs dorsales en l'absence de muscle soit une conséquence de ce contact.

Afin de surmonter les limites présentées par les expériences d'apoptose dans la paroi musculaire, il est possible d'agir directement sur la formation des muscles en affectant la spécification des FCs. Pour cela, l'utilisation de l'expression pan-mésodermale de la forme active de Notch NICD a été réalisée (Figure 16). Cette approche est identique à celle qui a permis de montrer la dépendance de la défasciculation des axones moteurs à la présence des muscles (Landgraf *et al.*, 1999). Mais dans cette étude, le phénotype observé suite à l'expression de NICD est sévère avec un blocage presque total de la spécification des FCs et des AMPs. Cet effet est notamment dû à l'augmentation de la température à 29°C pour l'incubation des embryons qui induit une augmentation de l'effet du système GAL-4/UAS. De plus, le pilote (24B-GAL4) utilisé est exprimé non seulement au sein du mésoderme mais aussi dans les fibres musculaires (jusqu'au stade 16). Une autre approche a consisté à utiliser une température plus permissive de 25°C, et à utiliser un pilote Twist-GAL4 dont l'expression diminue fortement à partir du stade 13. Dans ce contexte, les embryons présentent une destruction partielle et stochastique de la paroi musculaire. Ces conditions permettent une conservation de la spécification de certaines AMPs qui sont révélées par l'anticorps anti-Twist. D'un point de vue positionnel, toutes les AMPs ne sont pas affectées d'une manière équivalente. Par exemple, les vAMPs sont souvent dupliquées au sein d'un segment avec une absence du muscle VA3. Cette cellule surnuméraire proviendrait de la division asymétrique du PC à l'origine de la vAMP et de sa cellule sœur la FC du VA3 dont les destins dépendent de l'activation de la voie N. Les lAMPs et SBM sont présents de façon aléatoire mais ils restent toujours indissociables ne permettant pas d'observer un effet des lAMPs sur l'établissement de la branche latérale de la SNa (L-SNa). Du côté dorsal, la surexpression mésodermale de NICD est très informative. Une première observation est l'indépendance de la guidance de l'ISN par rapport à la présence des dlAMPs. En effet, l'absence des dlAMPs dans un segment ne bloque pas la migration de l'ISN qui conserve la capacité d'atteindre les muscles du territoire dorsal. En parallèle, les dAMPs sont particulièrement résistantes à la surexpression de NICD. Cependant, ces dernières, ainsi que les dlAMPs survivantes, sont souvent délocalisées au sein d'un segment donné. Il en résulte que le trajet de l'ISN est dévié en direction de ces AMPs délocalisées. Ces données permettent de confirmer que les AMPs

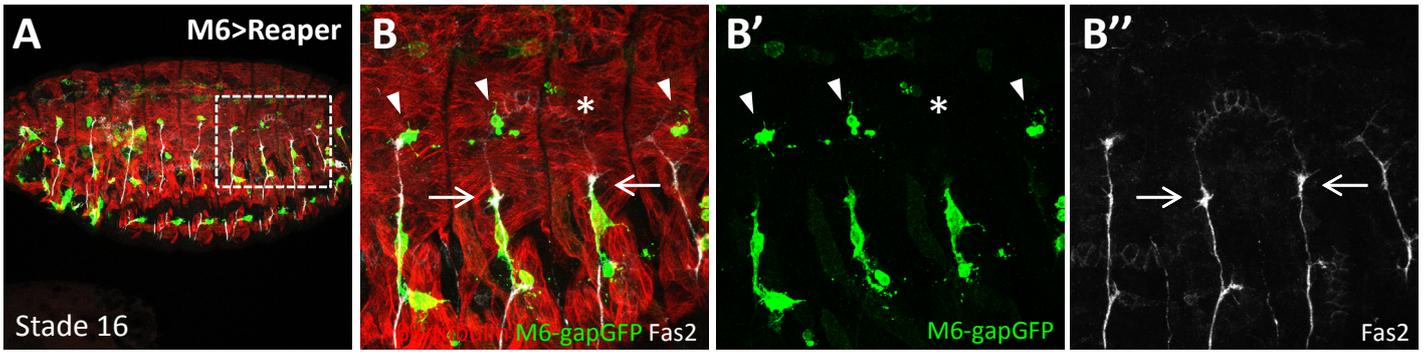


Figure 17: L'apoptose des dAMPs peut induire un défaut de migration de l'ISN

A. Vue dorso-latérale d'un embryon M6-gapGFP;M6>Reaper de stade 16. Les muscles sont révélés par un marquage contre la β 3-tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). **B-B''.** Vue zoomée (rectangle blanc en **A**) montrant soit une absence (astérisques blancs), soit des corps apoptotiques des AMPs (têtes de flèches blanches). Dans deux segments où les AMPs sont rentrés totalement ou partiellement en apoptose, l'ISN stoppe sa migration au deuxième point de branchement au niveau des muscle DA2 et DO2 (flèches blanches).

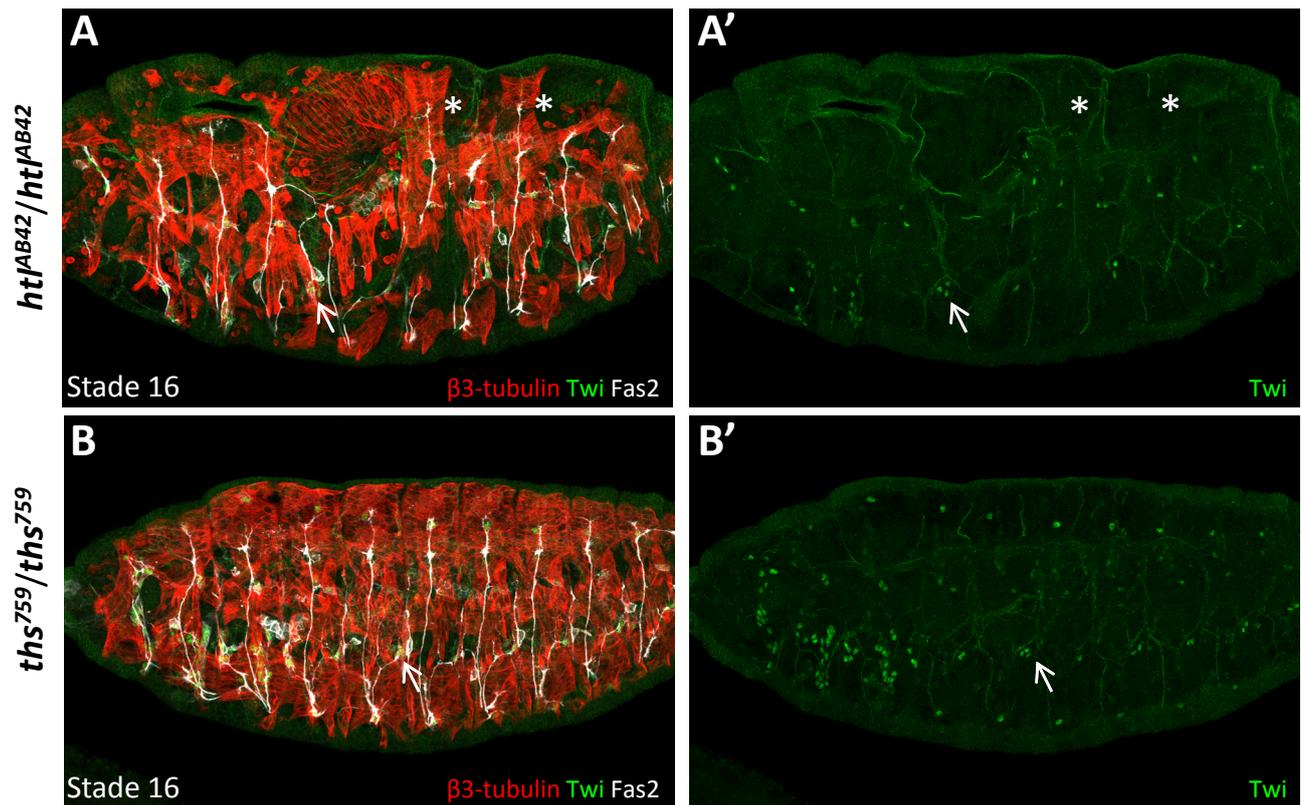


Figure 18: La voie FGF influence la spécification des AMPs mais l'absence de dAMPs n'impacte pas la migration de l'ISN

Vues latérales d'embryons de stade 16 de mutants pour le récepteur aux FGFs Heartless (Htl) (**A-A'**) ou pour son ligand Thisbe (Ths) (**B-B'**). Les muscles sont révélés par un marquage contre la β 3-tubulin (en rouge), les AMPs par des anticorps anti-Twi (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). **A-A'.** L'absence de dAMPs dans les segments dorsaux possédant une musculature n'est pas associée à un défaut d'innervation de l'ISN (astérisques blancs). Dans la région latérale, la mutation de *htl* peut entraîner l'apparition d'une troisième IAMP accompagnée d'une duplication du SBM (Flèches blanches). **B-B'.** La mutation de *ths* conduit à un phénotype similaire dans la région latérale (Flèches blanches).

de la région dorsales possèdent bien une capacité d'attraction de l'ISN. En revanche, il n'est pas possible de conclure sur un éventuel rôle des dAMPs dans la migration de l'ISN.

1. Impact des dAMPs sur la migration de l'ISN :

La spécification des dAMPs n'est donc pas sensible aux manipulations de la voie N dans le mésoderme qu'il s'agisse de l'expression de NICD ou de Numb. Afin d'observer le rôle des dAMPs dans l'attraction de l'ISN, une simple ablation génétique des dAMPs a tout d'abord été réalisée. L'apoptose dans les AMPs par l'expression de Reaper grâce au pilote M6-GAL4 peut conduire à la disparition de dAMPs dans certains segments (Figure 17). Les AMPs étant relativement résistantes à l'apoptose, peu de segments ont pu être analysés. Néanmoins, la perte de la dAMP d'un segment peut être accompagnée d'un phénotype dit « stall » sur l'ISN. Dans ce cas, l'ISN reste bloquée au niveau de son deuxième point de branchement juste avant les 4 muscles dorsaux DA1, DA2, DO1 et DO2. Cette configuration laisse supposer un éventuel effet de la présence des dAMPs sur l'attraction et la migration de l'ISN dans le domaine dorsal. Ce phénotype n'est pas présent dans l'ensemble des segments présentant une absence de dAMPs. Dans de nombreux cas, on retrouve une ISN correctement positionnée malgré la perte de la dAMP. Cette observation peut être expliquée par l'expression tardive du pilote M6-GAL4 qui commence à s'exprimer faiblement à partir du stade 12. Il est donc fortement probable que les dAMPs de ces segments soient rentrées en apoptose après le contact avec l'ISN. De plus, les muscles dorsaux sont atteints par l'ISN dès le stade 14 pour les segments les plus postérieurs. Il ainsi est nécessaire de trouver des contextes génétiques permettant de bloquer la formation des dAMPs sans pour autant perturber la formation des muscles dorsaux.

Contrairement aux IAMPs, jusqu'ici la perte d'AMPs dorsales n'avait jamais été rapportée. Comme illustré en figure supplémentaire 3 de l'article, un tel contexte a pu être obtenu avec la surexpression pan-mésodermale de l'iTF Pox meso. En effet, même si la majorité des segments présentent une duplication des dAMPs, il est aussi possible, dans de rares cas, d'observer une absence de dAMP. Au cours de ce projet, nous avons pu mettre en évidence que la mutation nulle du gène *htl* codant pour un récepteur aux FGFs peut entraîner l'absence de spécification des dAMPs. Les embryons *htl* présentent de forts défauts dans la migration du mésoderme en région dorsale pouvant aller jusqu'à la disparition du cœur et

des muscles dorsaux (Figure 18). Cet effet n'est pas complètement pénétrant et permet l'observation de certains segments présentant alors une paroi dorsale proche de celle d'un embryon sauvage. Au sein de ces segments, on constate aussi la disparition des dAMPs. En effet, en plus de son effet sur la migration du mésoderme, le récepteur Htl est aussi impliqué dans la sélection des PCs (Halfon *et al.*, 2000). La voie FGF intervient donc dans la sélection ou la division du PC à l'origine de la dAMP. La mutation nulle de *htl* ne semble pas avoir d'impact sur la migration de l'ISN, et on retrouve dans ces segments dépourvus de dAMP une ISN qui reste capable d'atteindre les muscles les plus dorsaux. Ces résultats, avec ceux préalablement obtenus avec les embryons *Twil>Pox meso*, permettent de confirmer l'indépendance de la migration de l'ISN par rapport à la présence des dAMPs.

On constate ainsi une contradiction entre les expériences de *M6>Reaper*, et le blocage de la spécification des dAMPs. Cette disparité dans les résultats peut provenir entre autres de l'expression ectopique du pilote *M6-GAL4* dans les MNs de l'ISN tels que les MNs pionniers aCC et RP2. Cependant, une seconde hypothèse sur les résultats obtenus avec les expériences d'apoptose dans les AMPs serait celle d'un potentiel délai sur la migration de l'ISN vers les muscles les plus dorsaux en cas d'absence de dAMP. Afin de tester cette hypothèse, il sera nécessaire d'effectuer des expériences d'ablation laser en contexte *M6>lifeactin-GFP* permettant la visualisation simultanée des AMPs et du système nerveux moteur.

Pour résumer, les différentes expériences réalisées au niveau de la région dorsale ont permis de montrer que les dIAMPs et les dAMPs possèdent une capacité d'attraction sur l'ISN, mais ne sont pas nécessaires pour la navigation de l'ISN *per se*. On observe ici une forte différence avec l'interaction décrite entre IAMPs et L-SNa. Cette relation a été approfondie en étudiant plusieurs contextes non mentionnés dans le futur article car encore préliminaires.

2. Données supplémentaires sur les relations entre IAMPs et L-SNa :

Avant de présenter ces résultats, il est intéressant de revenir sur l'étude des mutants *htl*. Une partie de ce projet a consisté à perturber la formation des IAMPs. Néanmoins, le contrôle des divisions ou la spécification des PCs reste encore un domaine non-exhaustif et complexe. L'observation de la région latérale des mutants *htl* a pu mettre en évidence que

dans une faible proportion de segments, on peut constater l'apparition d'une IAMP surnuméraire. La formation de cette nouvelle IAMP est aussi accompagnée de la duplication du SBM. Or, une telle situation a déjà été décrite lors de l'étude de mutants nuls pour le gène d'identité *S59* (Knirr *et al.*, 1999). L'apparition d'un nouveau muscle SBM et d'une IAMPs est corrélée à la transformation du PC *S59* positif à l'origine des FCs du LO1 et du VT1. En l'absence de *S59*, ce PC exprime désormais l'iTF Lb spécifique du PC à l'origine des SBM et IAMPs. Dans le segment illustré ici (Figure 18A), on observe aussi la perte du LO1 et du VT1. Cependant, la perte de ces muscles dans un mutant *htl* peut aussi être due à l'effet *Htl* sur la sélection des PCs puisqu'on observe approximativement la perte de la moitié des muscles constituant un segment. Afin de mieux caractériser ce rôle de la voie FGF dans la formation des IAMPs, l'effet de la mutation de l'un des ligands FGFs *Ths* a aussi été analysé. La perte de *Ths* peut elle aussi entraîner une duplication du SBM avec la formation d'une IAMP supplémentaire. Dans ce cas, on constate que les muscles VT1 et LO1 sont correctement spécifiés. Ces résultats complètent l'étude du rôle des ligands FGFs (Klingseisen *et al.*, 2009) et indiquent que la voie FGF joue non seulement un effet sur la sélection des PCs, mais semble aussi avoir un effet additionnel non rapporté sur la division du PC à l'origine des SBM/IAMPs. Une autre hypothèse consiste à envisager que l'absence de la voie FGF ait une influence sur le devenir de la 4^{ème} cellule spécifiée au niveau du PC SBM/IAMPs qui normalement rentre en apoptose (Jagla *et al.*, 1998). Ces observations récentes n'ont malheureusement pas encore pu être approfondies mais l'analyse de l'effet sur les IAMPs de l'absence de *Pyramus* (le deuxième ligand de *Htl*) permettra de distinguer s'il s'agit d'un rôle général de la voie FGF ou plus spécifique du ligand *Ths*.

Ainsi, il existe une relation d'inhibition mutuelle entre l'iTF *S59* et l'iTF Lb (Knirr *et al.*, 1999 ; Junion *et al.*, 2007). L'expression ectopique dans le mésoderme de *S59* provoque des phénotypes sévères dans la région latérale avec des disparitions des IAMPs et d'IAMPs mais aussi du muscle SBM (Knirr *et al.*, 1999). Ceci confère un contexte de choix pour l'étude de l'impact des IAMPs et de leur rôle dans la mise en place de la SNa. L'expression de *S59* en utilisant le pilote *Twist-GAL4* induit effectivement une forte déstructuration de la paroi musculaire. Ceci conduit notamment à une forte létalité en fin de phase embryonnaire. Les analyses de ce phénotype sont encore préliminaires mais on peut rarement observer (n=2 hémisegments) une perte du SBM, sans pour autant affecter la formation des IAMPs (Figure

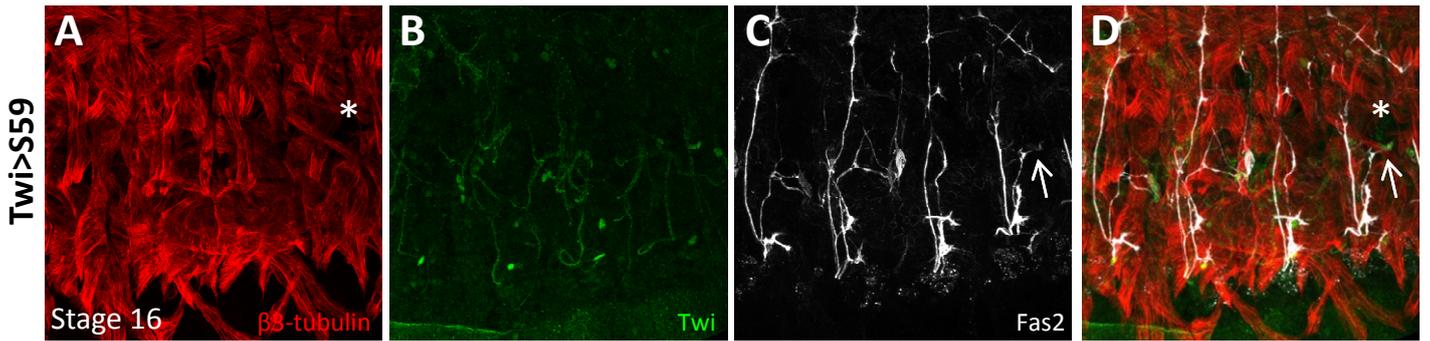


Figure 19: Les IAMPs sont suffisantes pour induire la formation de la L-SNa

A-D. Vue latérale zoomée d'un embryon de stade 16 *Twi>S59*. Les muscles sont révélés par un marquage contre la $\beta 3$ -tubulin (en rouge), les AMPs par des anticorps anti-Twi (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). L'absence de SBM dans un segment (astérisques blancs) n'influence pas le contact entre les IAMPs et la SNa (Flèches blanches).

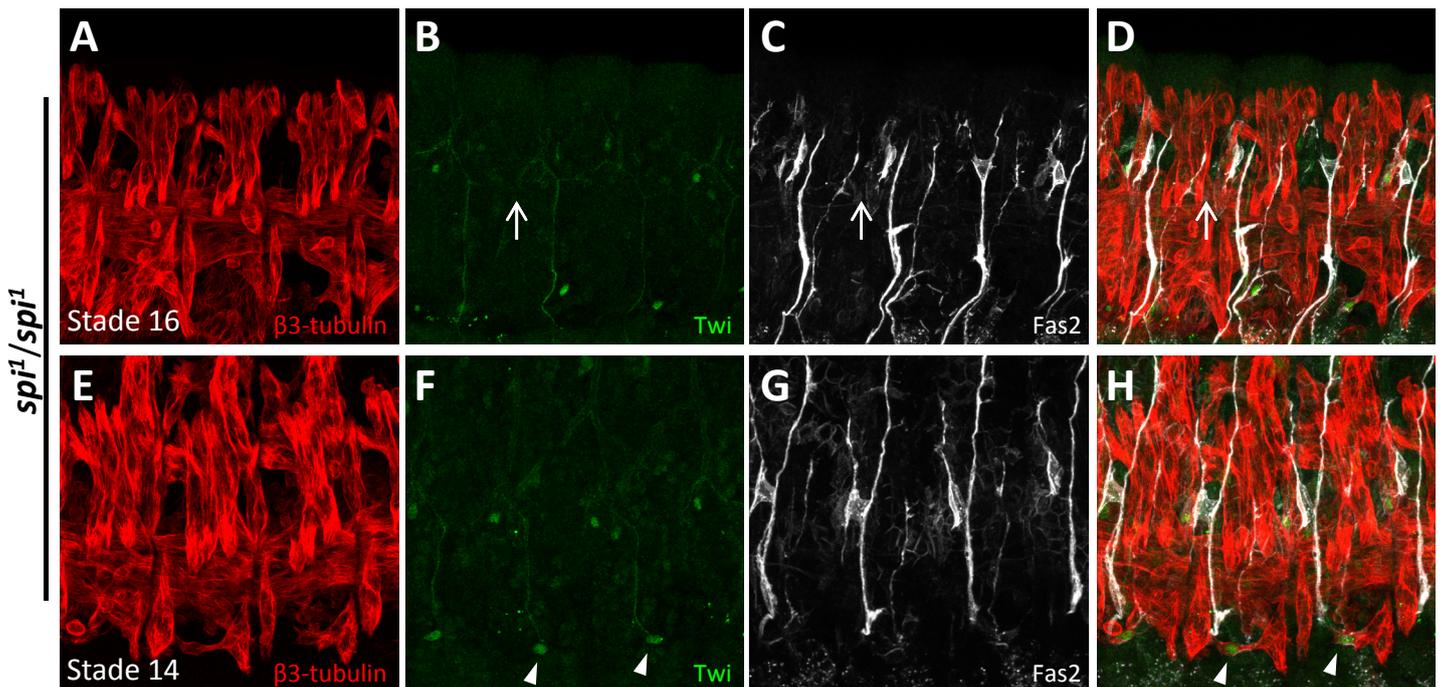


Figure 20: La voie EGF affecte la spécification et le comportement des AMPs

Vue latérale zoomée d'embryons mutants pour le ligand EGF Spi de stade 16 (**A-D**) ou de stade 14 (**E-F**). Les muscles sont révélés par un marquage contre la $\beta 3$ -tubulin (en rouge), les AMPs par des anticorps anti-Twi (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). **A-D.** La disparition des IAMPs dans un segment possédant encore le muscle SBM est associée à une perte de la L-SNa (flèches blanches). **E-H.** Les vAMPs expriment la protéine associée à la différenciation musculaire $\beta 3$ -tubulin, et adoptent une forme proche de celle d'une fibre musculaire (têtes de flèches blanches).

19). Il s'agit à ce jour du seul contexte qui a permis d'obtenir la spécification de cellules IAMPs sans être associé à la présence d'un SBM. Dans un tel segment n'ayant jamais formé de muscle SBM, on observe néanmoins que la SNa rentre en contact avec les IAMPs. Ces premiers résultats, associés aux expériences de Reaper dans le muscle SBM, semblent confirmer que les IAMPs sont nécessaires et suffisantes pour la formation de la L-SNa.

Il existe dans la littérature une dernière étude qui a déjà recensé l'absence de IAMPs dans un ou plusieurs segments. Il s'agit de la mutation du ligand de la voie EGF Spitz (*Spi*) (Figeac et al., 2010). L'absence de *Spi* est associée à de nombreux phénotypes au cours de l'embryogenèse. Par exemple, *spi* est impliqué dans la sélection des PCs et induit la perte de nombreux muscles s'il est absent (Buff et al., 1998). Parmi ces muscles, on retrouve le SBM dont la formation est donc dépendante de l'activation de la voie EGF par *Spi*. La mutation de *spi* a aussi été associée à des perturbations des axones moteurs. Il s'agit d'une étude sur l'impact des cellules gliales périphériques (PGs) sur la mise en place des systèmes nerveux moteur et sensoriel (Sepp et Auld, 2003). Affecter la voie EGF spécifiquement dans les PGs est suffisant pour provoquer l'apparition de perturbations dans l'organisation du système nerveux périphérique. Mais l'étude du mutant *spi* présente des différences par rapport aux autres mutants de la voie EGF. D'une part, le mutant *spi* est le seul contexte qui n'affecte pas l'expression par les PGs du marqueur Gliotactin, et d'autre part les PGs présentent un comportement normal dans l'ensemble malgré quelques défauts morphologiques (Sepp et Auld, 2003). De plus, l'impact de la perte de *spi* sur la paroi musculaire n'est pas mentionné dans cette étude mais peut aussi expliquer le profil altéré des axones périphériques. Dans ce contexte, l'observation du système nerveux moteur associé au marquage des AMPs et de la paroi musculaire dans les mutants *spi* a été réalisée (Figure 20). Dans un nombre réduit de segments, on arrive à observer une absence de IAMPs tout en conservant la présence du SBM. Dans ces segments, la branche L-SNa ne se forme toujours pas, confirmant l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent. Cependant, il s'agit aussi du seul contexte où on peut rapporter une absence de L-SNa en présence de SBM et de IAMPs. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle de la voie EGF dans la formation de la L-SNa. On peut ainsi envisager que comme préalablement publié ce rôle soit dû aux PGs (Sepp et Auld, 2003). Néanmoins, il est aussi possible d'émettre l'hypothèse d'un rôle de la voie EGF dans les IAMPs ou encore dans les MNs sachant que ces deux types cellulaires activent la voie EGF (Figeac et al., 2010 ;

Skeath, 1998). Les expériences visant à tester ces hypothèses n'ont pas encore pu être réalisées. D'une façon plus surprenante, l'étude de ces mutants révèle aussi que dans certains segments les AMPs ventrales commencent à exprimer le marqueur musculaire β -tubuline laissant suggérer un début de différenciation de ces dernières. Cette observation est la première rapportant un tel phénotype. Des analyses complémentaires seront nécessaires afin de vérifier si ces vAMPs expriment d'autres marqueurs de différenciation musculaire tel que le facteur myogénique Mef2.

III. Approche génétique du rôle des AMPs dans l'innervation :

Etudier le rôle des AMPs sur la mise en place du système nerveux revient à ajouter un nouvel acteur dans un processus qui a déjà été analysé extensivement. Il est donc possible que certains contextes préalablement étudiés puissent avoir un effet sur les AMPs qui aurait été négligé. Pour tester cette hypothèse, une première approche consiste à reprendre l'analyse des gènes connus comme étant exprimés dans les AMPs ayant aussi un effet sur la guidance des axones. Parmi ces candidats, on retrouve le facteur de transcription *Zfh1*, la molécule d'adhésion *Fas2* ou encore le récepteur *Unc-5*.

Dans ces conditions, une approche par ARN interférence (RNAi) a tout d'abord été envisagée. Mais l'utilisation du RNAi avec le pilote M6-GAL4 ne fonctionne que très peu. Ceci pourrait être dû par exemple au début d'expression tardif du pilote (stade 12) ne permettant pas au système RNAi de fonctionner de façon optimale. Même l'ajout d'un UAS-Dicer2, utilisé pour augmenter l'efficacité du RNAi (Dietzl *et al.*, 2007), ne conduit pas à une amélioration. En effet, le test de plusieurs RNAi (VDRC KK et GD, TRIP, communauté) dirigés contre des gènes connus comme exprimés dans les AMPs, tels que *twist*, *zfh1* ou encore *bib*, ne permet pas d'observer de diminution de l'intensité du marquage des protéines codées par ces gènes au cours de l'embryogenèse. Une approche alternative a été effectuée reposant sur l'expression simultanée de la protéine Cas9 et d'ARNs guides afin d'induire des mutations dans les gènes ciblés. Mais comme pour le RNAi, des expériences sur les gènes *twist*, *bib* et *Lb* n'ont pas conduit à la réduction de l'expression des protéines correspondantes. Les guides utilisés ont préalablement été validés *in vivo* par injection en embryon et sont pourtant capables de provoquer des mutations dans ces gènes. Ainsi, on peut conclure qu'à l'heure actuelle, ces deux méthodes ne sont pas optimales pour des

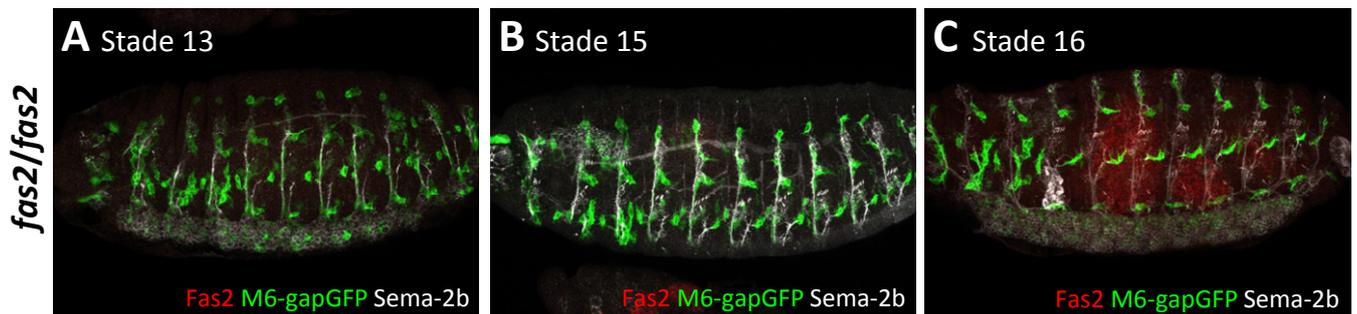


Figure 21: L'absence de Fas2 n'a pas d'effet sur le comportement des AMPs

A-C. Vues latérales et dorso-latérales d'embryons mutants pour *fas2* de stade 13 à 16. Les AMPs sont révélées par le transgène M6-gapGFP (en vert), et les systèmes nerveux moteurs et sensoriels par des anticorps anti-Sema-2a (en blanc). Le marquage Fas2 (en rouge) est utilisé pour confirmer la perte de Fas2 dans les embryons mutants. Le comportement des AMPs au cours de l'embryogenèse n'est pas affecté que ce soit dans le positionnement, la survie ou la migration.

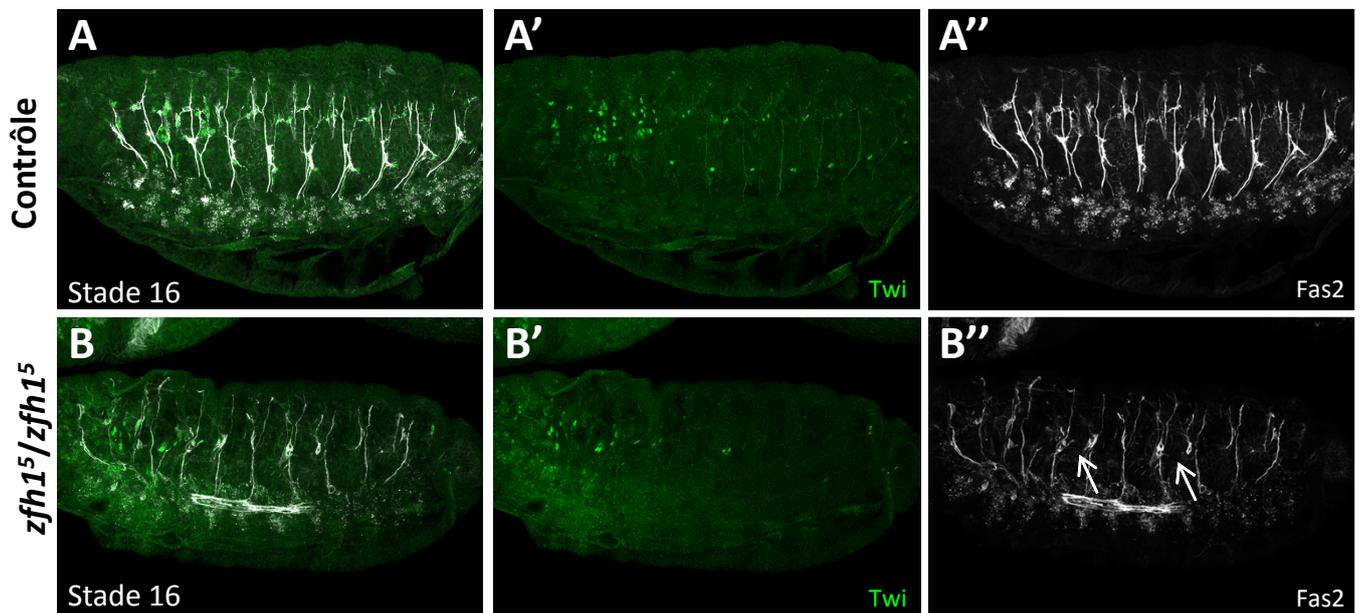


Figure 22: L'absence de Zfh1 entraîne une perte drastique des AMPs et de la SNa

Vues latérales d'embryons de stade 16 contrôle w^{1118} (A-A'') et mutant pour *zfh1* (B-B''). Les AMPs sont marquées par des anticorps anti-Twi (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). B-B''. L'absence de *Zfh1* entraîne une forte réduction du nombre d'AMPs mais aussi une absence de SNa (flèches blanches).

analyses en embryon probablement à cause de restrictions temporelles, d'intensité du pilote et/ou de demi-vie des protéines/ARNs. Il est aussi important de signaler que la simple expression de Cas9 dans les AMPs affecte les AMPs. Les embryons de lignées M6>Cas9 présentent notamment une augmentation du nombre de dAMPs pouvant aller jusqu'à quatre pour un segment donné. A cause de ces limites, la majorité des expériences menées au cours de ce projet se concentrent sur l'utilisation de surexpressions et d'expressions ectopiques via le système GAL4/UAS, ainsi que sur l'étude de différents mutants.

L'un des premiers marqueurs identifiés au niveau des AMPs est la protéine d'adhésion Fas2 (Vactor *et al.*, 1993). Malgré cela, le rôle de Fas2 au niveau des AMPs n'a jamais été étudié. On sait pourtant que le niveau d'expression de Fas2 par les AMPs augmente si ces dernières ne sont pas contactées par le système nerveux (Landgraf *et al.*, 1999). L'observation d'un mutant pour *fas2* généré au laboratoire, combiné avec le transgène M6-GapGFP, permet la visualisation des AMPs en absence de Fas2 (Figure 21). Comme c'est le cas pour les axones moteurs (Grenningloh *et al.*, 1991), la perte de Fas2 n'influence pas le comportement des AMPs. La migration, le positionnement ou encore la présence de filopodes demeurent inchangés. Différentes études de surexpression et d'expression ectopique ont pu montrer que l'effet de Fas2 peut être dose dépendant (Lin *et Goodman*, 1994 ; Silies *et Klämbt*, 2010). La surexpression de Fas2 dans les AMPs ou dans les muscles ne présente en revanche pas de phénotype particulier que ce soit sur le comportement des AMPs ou leur association au système nerveux moteur. Ainsi, le rôle de cette expression de Fas2 par les AMPs reste encore à déterminer. Il est possible que la fonction de Fas2 soit redondante avec d'autres protéines telles que les membres des Sides ou encore d'autres protéines d'adhésion exprimées par les AMPs qui restent encore à mettre en évidence.

Un autre exemple de rôle potentiel des AMPs est illustré par l'effet de la perte de fonction de *zfh1* sur les axones des MNs. Ce facteur de transcription exprimé par les MNs agit sur la sortie des axones du CNS mais aussi sur la guidance terminale des axones grâce au contrôle de l'expression de protéines impliquées dans la guidance telles que UNC-5, Neuroglian ou Beat-1a (Layden *et al.*, 2006 ; Zarin *et al.*, 2014). Les expériences de réexpression de *Zfh1* dans les MNs de mutants *zfh1* avec le pilote Elav-GAL4 montrent un sauvetage complet de la sortie des axones, mais seulement partiel pour la guidance et l'innervation terminale des axones (Layden *et al.*, 2006). Ceci suggère un rôle de *Zfh1* dans d'autres tissus périphériques

tels que le mésoderme en cours de développement (Lai et al., 1991), dans les PGs (Ohayon et al., 2009) et surtout dans les AMPs (Lai et al., 1993). D'une façon intéressante, l'absence de *Zfh1* provoque des phénotypes dans la paroi musculaire mais aussi au niveau des AMPs (environ 25% des AMPs dans un embryon mutant) avec des duplications, déplacements et quelques pertes d'AMPs (Lai et al., 1993). Ainsi, il est raisonnable de tester la corrélation entre les phénotypes observés sur les axones moteurs et les AMPs. L'observation des mutants *zfh1*⁵ a donc été réalisée (Figure 22). Malheureusement, et contrairement à ce qui a pu être publié, la perte de *Zfh1* présente un effet bien plus drastique. On observe une absence de SNa dans la grande majorité des segments (plus de 90% n=25) malgré la description de 80% des SNa capables de sortir du CNS présentant un simple défaut de migration terminale (Layden et al., 2006). On constate aussi la disparition de la grande majorité des AMPs pouvant aller jusqu'à une disparition quasiment complète de cellules Twist positives. Cette différence au niveau de l'effet sur les AMPs pourrait s'expliquer par l'utilisation de deux allèles nuls différents car les données précédemment obtenues proviennent de l'analyse de mutant *zfh1*². Néanmoins, ces deux allèles sont supposés présenter un phénotype similaire (Lai et al., 1993). L'absence de SNa ne permet pas l'observation d'un potentiel effet des AMPs dans ce contexte. Dans un avenir proche, il sera nécessaire d'observer les AMPs avec le sauvetage de *Zfh1* dans les MNs afin de pouvoir conclure sur un éventuel rôle de *Zfh1* dans les AMPs.

Après avoir mis en avant le rôle des AMPs dans l'attraction des nerfs, un crible de nombreuses molécules impliquées dans la guidance a été réalisé. Ceci a permis notamment de mettre en avant l'expression de *side* par les IAMPs. Un autre candidat potentiel a ainsi pu être identifié. Il s'agit du récepteur *Unc-5* principalement impliqué dans la répulsion via la transduction de signaux provenant des Netrins sécrétées. Cette expression a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation d'une construction transgénique obtenue à partir d'une région régulatrice de *Unc-5* reproduisant son expression dans les tissus périphériques (Asadzadeh et al., 2015). Lors de l'étude de l'expression de cette région régulatrice associée à la GFP, il a été mentionné la présence de GFP dans des cellules *Zfh1* positives dans la région dorsale. Or, ces cellules ont été identifiées comme appartenant au système nerveux sensoriel. Il était donc raisonnable de penser qu'il s'agisse en réalité des dAMPs. En effet, l'observation d'embryons UNC-5GH-GFP avec un marquage Twist montre une parfaite co-localisation

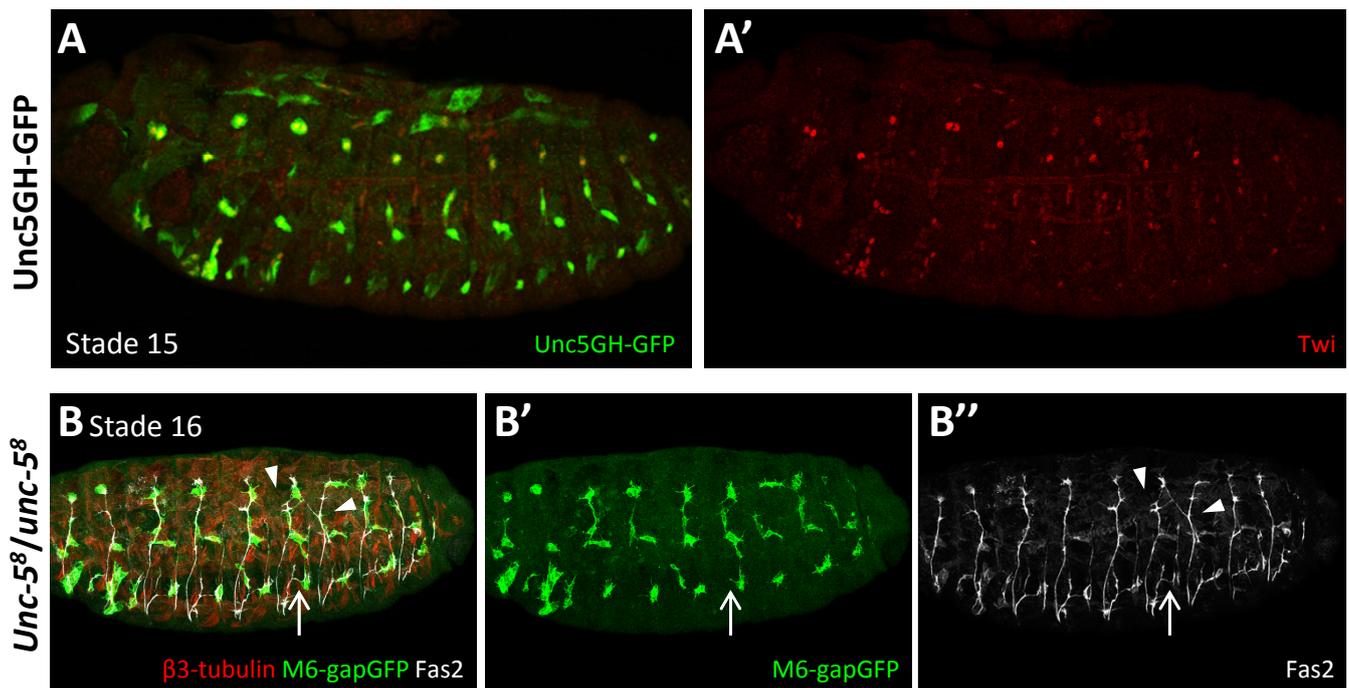


Figure 23: Les AMPs expriment Unc-5 dont la mutation peut influencer leur comportement

A-A'. Vue latérale d'un embryon de stade 15 portant le transgène Unc5GH-GFP, rapporteur de l'expression du récepteur Unc5. On observe une co-localisation entre les cellules exprimant fortement la GFP (en vert) et le marquage des AMPs avec l'anticorps anti-twist (en rouge). **B-B''**. Vue latérale d'un embryon de stade 16 mutant pour *unc-5*. Les muscles sont révélés par un marquage contre la β 3-tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). On observe des défauts caractéristiques de la perte de Unc-5 sur le système nerveux moteur avec un arrêt de migration de l'ISN et un franchissement de la bordure de segment (têtes de flèches blanches). Ces défauts ne semblent pas directement associés à des perturbations des AMPs. On observe cependant des comportements anormaux dans la migration des IAMPs qui peuvent être associés à une trajectoire anormale de la L-SNa (flèches blanches).

entre la GFP et Twi indiquant que les AMPs expriment bien Unc-5 (Figure 23A-A'). Cette expression n'est pas limitée aux dAMPs, on retrouve aussi un marquage GFP dans les autres cellules AMPs. Cependant, l'analyse des mutants *unc5⁸* ne permet pas de conclure sur le rôle de Unc-5 dans les AMPs. En effet, les embryons *unc5⁸* portant le transgène M6-GapGFP ne montrent pas de fortes perturbations au niveau des AMPs. Bien que la migration des dIAMP ne soit pas affectée, il reste possible d'observer dans certains segments des défauts de migration des IAMPs ou encore des dAMPs qui semblent se déplacer vers les bordures de segments. Cependant ces défauts restent marginaux et la majorité des segments apparaissent normaux. L'absence d'extension et le franchissement des bordures de segments observés au niveau de l'ISN sont caractéristiques de la mutation nulle de *unc-5* (Labrador *et al.*, 2005). Dans ce contexte, ces défauts de l'ISN ne sont pas associés à une absence ou un déplacement des AMPs de la région dorsale. D'une manière générale, les interactions entre AMPs et axones moteurs n'apparaissent pas modifiées. Même lorsque l'ISN se déplace vers un segment adjacent, la dAMP de ce segment reste toujours la cible terminale de la migration de l'ISN. Dans la région latérale, les segments présentant une migration anormale des IAMPs sont aussi associés à des défauts de trajectoire de la SNa. Mais dans l'ensemble des segments, la SNa reste capable d'atteindre les IAMPs et le SBM. Ainsi, le récepteur Unc-5 exprimé par les AMPs n'apparaît pas comme nécessaire pour la guidance et l'établissement du contact entre les AMPs et les nerfs. Toutefois, les résultats au niveau de la région latérale suggèrent que le comportement des IAMPs, et principalement de la IAMP antérieure, puisse affecter le trajet de la L-SNa.

IV. Interactions des IAMPs avec les muscles avoisinants :

L'analyse des mutants *prospero* a aussi pu montrer que le comportement des AMPs est indépendant de la présence des axones des MNs. En effet, le positionnement et la survie des AMPs ne sont pas affectés. De plus, la IAMP antérieure et la dIAMP dorsale conservent leurs capacités de migrer. Cette capacité migratoire des AMPs reste un sujet qui n'a pas encore été abordé dans la littérature. Afin de mieux comprendre les interactions des AMPs avec leur environnement, une analyse de l'attraction des IAMPs par les muscles, ainsi que de son rôle potentiel a été initiée. Pour les dIAMPs, en prenant en compte le trajet migratoire perpendiculaire aux fibres musculaires et l'apposition de cette AMP avec le système nerveux

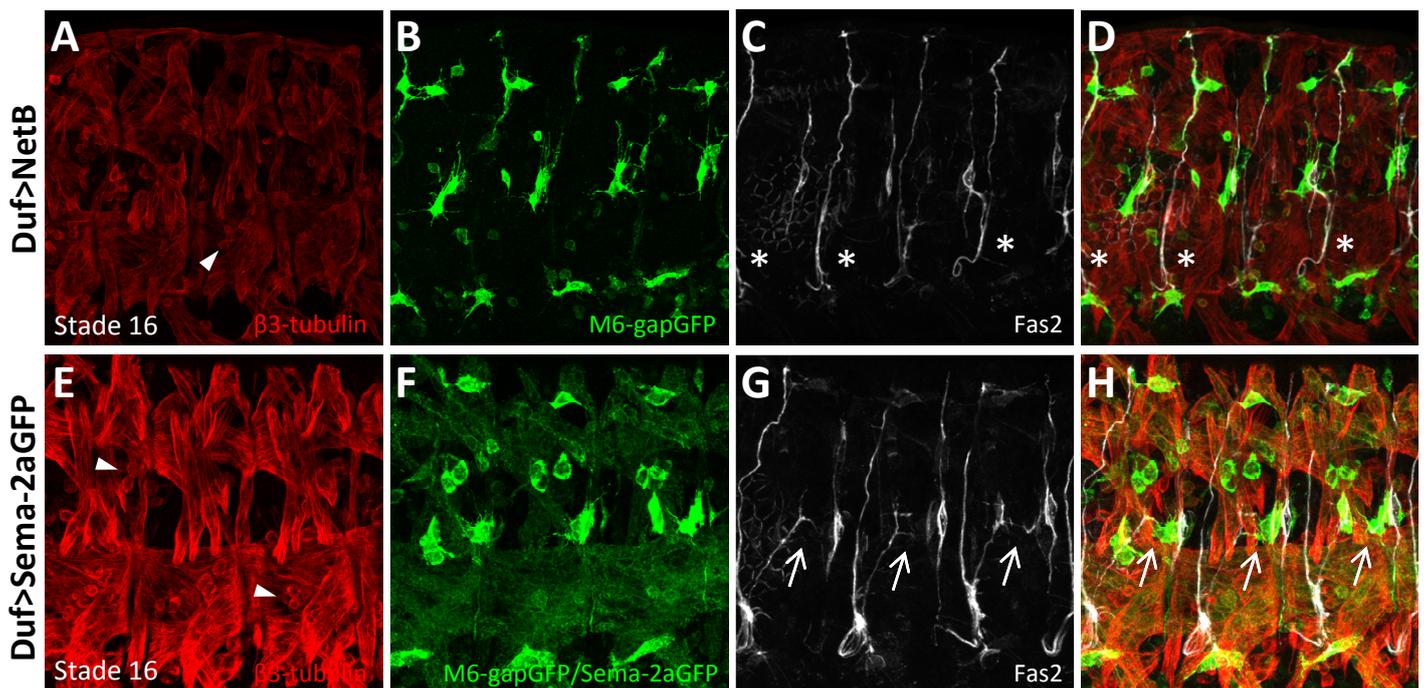


Figure 24: L'expression ectopique de molécules de guidance par les muscles peut affecter le comportement des AMPs

Vues latérales zoomées d'embryons de stade 16 Duf>NetB (A-D) ou Duf>Sema-2a (E-H). Les muscles sont révélés par un marquage contre la $\beta 3$ -tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). L'expression ectopique de ces deux molécules de guidance provoque de légers défauts de fusion au niveau de la paroi musculaire avec l'apparition de myoblastes non fusionnés (têtes de flèches blanches). A-D. L'expression de NetB provoque une absence de la SN dans une majorité des segments (astérisques blancs). Le comportement des IAMPs est aussi affecté avec une absence de migration antérieure. (E-H) La présence de Sema-2aGFP est aussi révélée par l'anticorps anti-GFP (en vert). On observe non seulement un défaut de migration des IAMPs, mais aussi des trajectoires anormales de la L-SNa (flèches blanches).

périphérique, il est probable que le support de cette migration soit le système nerveux sensoriel encore présent dans les mutants *prospero*. En revanche, la région occupée par les IAMPs est dépourvue de système nerveux sensoriel pouvant servir de matrice pour la migration. Les muscles représentent alors un candidat potentiel comme moteur pour la migration de la IAMP antérieure.

1. Expression ectopique de molécules de guidance par les muscles :

Une ancienne étude rapporte que la surexpression de certaines molécules de signalisation possède un effet sur la guidance du système nerveux (Winberg *et al.*, 1998). Il a été montré que l'expression d'un membre des Sémaphorines, Sema-2a possède un effet sur la branche latérale de la SNa, mais aucune attention n'a été portée sur les AMPs. En utilisant le pilote Duf-GAL4 pour exprimer une forme de Sema-2a associée à la GFP, on peut remarquer que cette expression possède non seulement un effet sur la trajectoire de la SNa, mais aussi sur la migration des IAMPs (Figure 24). La migration des IAMPs étant indépendante du système nerveux moteur, il est possible que ce défaut de placement soit à l'origine d'une mauvaise guidance de la SNa. Mais on ne peut exclure un effet direct de l'expression de sema-2a sur la SNa. Ces données suggèrent aussi que les IAMPs sont capables de répondre aux signaux Sémaphorines. Il sera intéressant de vérifier l'expression des récepteurs PlexA et PlexB dans les IAMPs. De plus, si Sema-2a semble plutôt impliqué dans la répulsion, d'autres Sémaphorines sécrétées par les muscles pourraient être associées à l'attraction des IAMPs. Parmi les molécules de signalisations affectant le système nerveux, on distingue aussi l'expression de la Netrin NetB. Lorsque l'on force l'expression de NetB dans les muscles, la migration normale de la SNa est bloquée conduisant à sa fasciculation avec l'ISN (Winberg *et al.*, 1998). L'effet de NetB sur la SNa est médié par l'expression de Unc-5 dans la SNa. Ce contexte présente l'intérêt de pouvoir suivre le comportement des IAMPs en absence de SNa. Cependant, l'expression de NetB par les muscles en utilisant le pilote Duf-GAL4 affecte aussi la migration des IAMPs (Figure 24). Les IAMPs restent fortement associées au SBM, ce qui suggère une répulsion active des IAMPs qui peut être expliquée par l'expression de Unc-5 dans ces cellules. Il est prévu de vérifier cette hypothèse en reproduisant la surexpression de NetB dans un contexte mutant pour *unc-5*. Ces deux expériences ont permis de montrer qu'il est possible d'affecter les IAMPs en agissant sur les muscles.

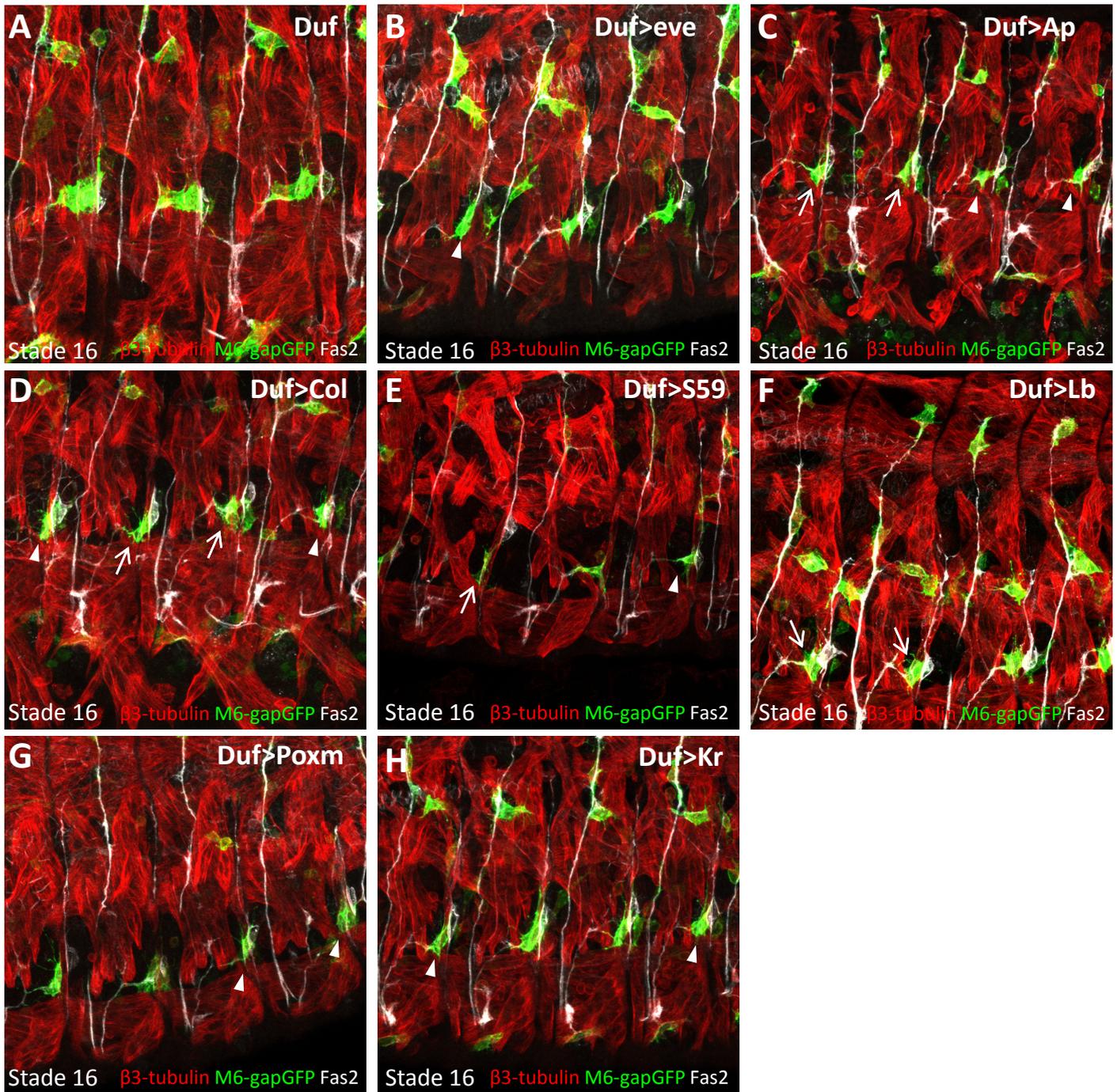


Figure 25: L'identité musculaire joue un rôle important dans la migration des IAMPs

Vues latérales zoomées d'embryons de stade 16 contrôle DufGAL4;;M6-gapGFP (A), ou exprimant différents facteurs de transcription d'identité (iTFs) sous le contrôle du pilote Duf (B-H). Les muscles sont révélés par un marquage contre la $\beta 3$ -tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). B-H. L'expression ectopique des différents iTFs provoque des défauts variables dans les parois musculaires allant d'une forte altération pour S59 (E) à des parois peu affectées pour Poxm (G). L'ensemble de ces contextes présentent des défauts de migrations des IAMPs. On observe ainsi soit une absence de migration (têtes de flèches blanches), soit une migration sur le muscle LO1 (flèches blanches). La trajectoire de la L-SNa est aussi perturbée dans de nombreux segments.

2. Rôle de l'identité musculaire sur les IAMPs :

Dans l'objectif de mieux comprendre les interactions entre muscles et AMPs, une approche de manipulation de l'identité des muscles a aussi été réalisée. En effet, l'expression d'iTFs est un des déterminants majeurs pour l'acquisition d'une identité propre à chaque muscle. L'expression ectopique de ces iTFs peut donc induire des changements d'identité dans les différents muscles ciblés. En utilisant le pilote Duf-GAL4 pour ne cibler que les FCs et les fibres musculaires, plusieurs iTFs ont été exprimés afin d'observer le comportement des AMPs et du système nerveux dans ces conditions (Figure 25). Parmi les iTFs disponibles pour cette expérience, on retrouve Eve, Poxm, Kr, Lb, Lms, S59 et Ap. L'expression de ces iTFs provoque de façon générale des défauts au niveau de la paroi musculaire. Mais l'expression plus tardive du pilote Duf-GAL4, par rapport au pilote Twist-GAL4, permet de minimiser l'effet des iTFs n'entraînant ainsi que peu de pertes de muscles (à l'exception de S59 qui provoque une forte déstructuration de la paroi (figure 25E)). En excluant les défauts musculaires, on observe un point commun à la majorité de ces contextes génétiques avec des IAMPs présentant soit une absence de migration, soit une migration déplacée vers le muscle LO1. Ainsi, modifier l'identité musculaire est suffisant pour observer un effet sur les IAMPs. De plus, on observe encore une fois des défauts de trajectoires au niveau de la L-SNa, même si elle reste capable d'atteindre les IAMPs dans la majorité des contextes. D'une façon similaire à l'expression ectopique de molécules de signalisation, on ne peut exclure que l'effet observé sur la L-SNa soit causé directement par le changement d'identité des muscles. Par exemple, on observe que l'expression généralisée de l'iTF Col est suffisante pour bloquer la formation de la branche dorsale de la SNa malgré la présence des LTs innervés par cette branche. Bien qu'établir un lien direct entre migration des IAMPs et orientation de la L-SNa soit encore à déterminer, il est évident que les muscles jouent un rôle dans ce comportement des IAMPs.

Afin de mettre en évidence les relations entre IAMPs et leur environnement musculaire, une première approche d'imagerie *in vivo* a été mise en place. Dans la région latérale, les IAMPs sont entourées par les muscles SBM, VL1, LO1 et les LTs. Afin de visualiser les interactions directes ou médiées par des filopodes, on observe simultanément les AMPs avec le transgène M6-GapGFP et les muscles par l'expression de LifeactinGFP ciblée dans chaque population via des pilotes spécifiques (Figure 26 ; Films 1-4). Cette expérience permet

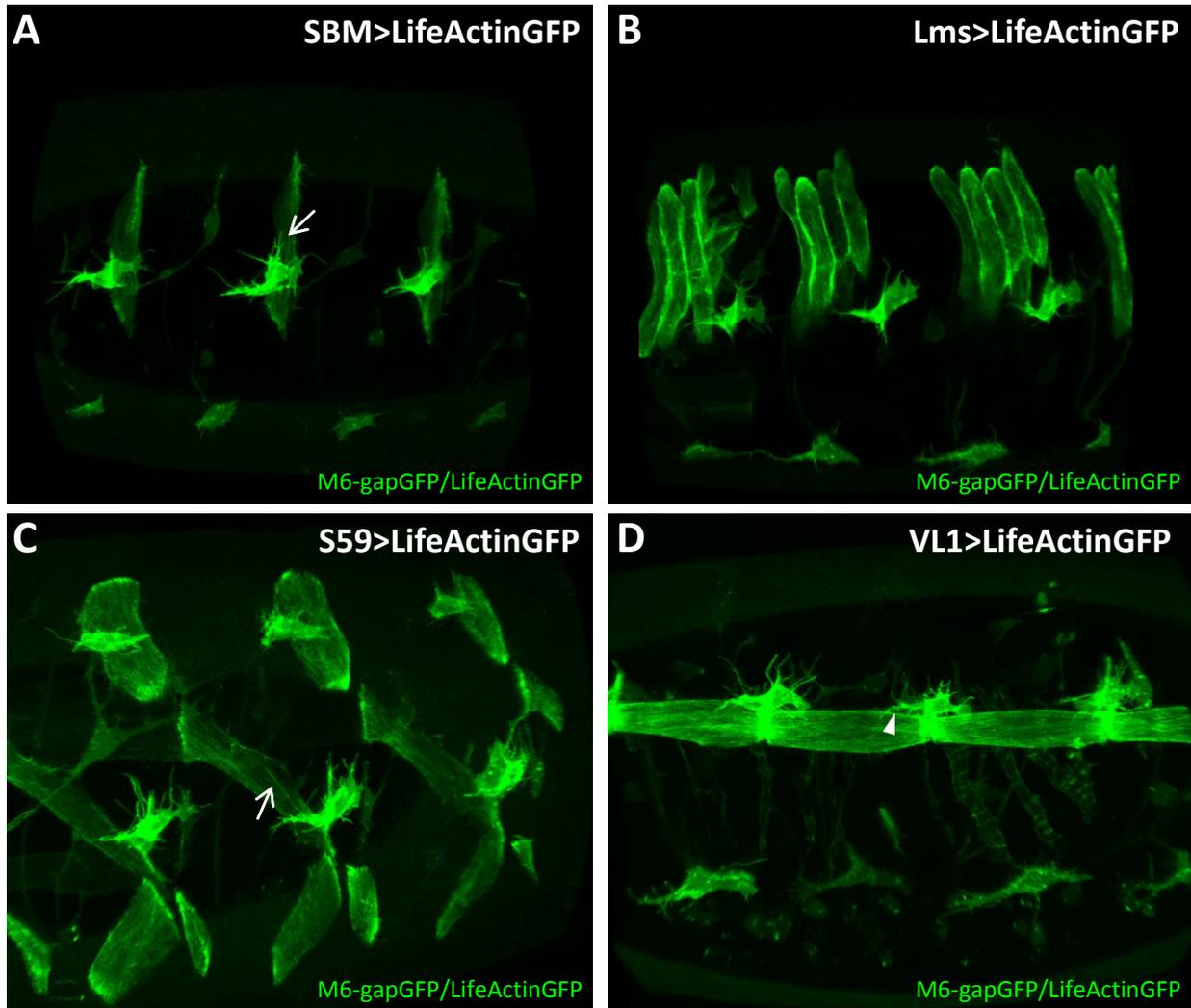


Figure 26: Visualisation *in vivo* de la dynamique des interactions entre IAMPs et leurs partenaires musculaires

A-D. Vues latérales zoomées, issues de films sur des embryons de stade 14-16 pendant 2h. Les AMPs sont marquées par le transgène M6-gapGFP, et les muscles par l'expression de LifeActinGFP grâce à des pilotes spécifiques de chaque type musculaire SBM (**A, Film 1**), LTs (**B, Film 2**), LO1 (**C, Film 3**) et VL1 (**D, Film 4**). Les films révèlent une forte dynamique des filopodes des IAMPs, mais aussi certains filopodes en contacts avec les muscles SBM et LO1 qui sont stabilisés (flèches blanches). **D.** L'observation des IAMPs et du VL1 montre que les IAMPs sont étroitement associées au VL durant l'étape de migration. On observe aussi la présence de filopodes (ou myopodes) partant du VL1 et contactant les IAMPs (tête de flèche blanche).

d'observer la migration des IAMPs, mais aussi la dynamique des filopodes des IAMPs et des muscles. Une première constatation a été le faible nombre de contacts entre IAMPs et muscles LTs malgré leur proximité, suggérant une indépendance des IAMPs vis-à-vis des muscles LTs. Ensuite, ces expériences ont permis de constater non seulement la proximité entre le SBM et les AMPs, mais aussi l'importance du muscle VL1 sur la migration de la IAMP antérieure qui utilise alors ce muscle comme support. On observe aussi des contacts de filopodes venant à la fois de l'AMP mais aussi du VL1 durant la migration, suggérant ainsi une participation active du VL1 sur la migration. En ce qui concerne l'activité filopodiale des AMPs, on voit une forte dynamique des filopodes mais aussi dans certain cas une stabilisation de certains de ces filopodes en contact avec les muscles SBM et parfois le LO1. On sait que les muscles agissent comme une niche pour les AMPs durant l'embryogenèse, les protégeant notamment de l'apoptose (Aradhya *et al.*, 2015). Ces contacts par les filopodes des AMPs pourraient alors intervenir dans le dialogue entre ces deux tissus. Afin d'éviter l'utilisation de la GFP dans les deux tissus, d'autres constructions ont été testées pour faciliter l'observation. Différentes formes de Lifeactin liée à des protéines fluorescentes telles que la RFP, Ruby ou encore Tomato, ont été utilisées mais ne permettent pas de visualisation efficace car ces dernières ne sont pas stables et perdent leur fluorescence rapidement. Une lignée transgénique associant la région régulatrice M6 avec l'expression de Tomato a été construite au cours de ce projet (utilisant un vecteur facilitant la visualisation des projections cytoplasmiques (Han *et al.*, 2011)) mais présente les mêmes défauts avec une perte rapide de la fluorescence en imagerie *in vivo*.

Suite à ces observations, des expériences d'ablations génétiques de ces muscles ont été réalisées afin d'observer la relation entre la migration des IAMPs et ces muscles. L'effet de l'apoptose des muscles LTs et LO1 est limité sur la migration. De même, comme présenté dans l'article, l'apoptose du muscle SBM peut avoir des effets sur le positionnement des AMPs mais n'agit pas sur la migration des IAMPs *per se*. En revanche, l'absence de VL1 affecte la migration des IAMPs, d'une façon similaire aux expériences de changement d'identité des muscles, avec soit un blocage, soit une migration détournée vers le LO1. Ceci suggère que le VL1 est bien le principal acteur de la migration des IAMPs (Figure 27A-D). Dans cette direction, des manipulations de l'identité du VL1 ont été commencées (Figure 27 D-L). Pour le moment, seul l'effet de deux iTFs a pu être observé, Eve et Lb. Ces croisements

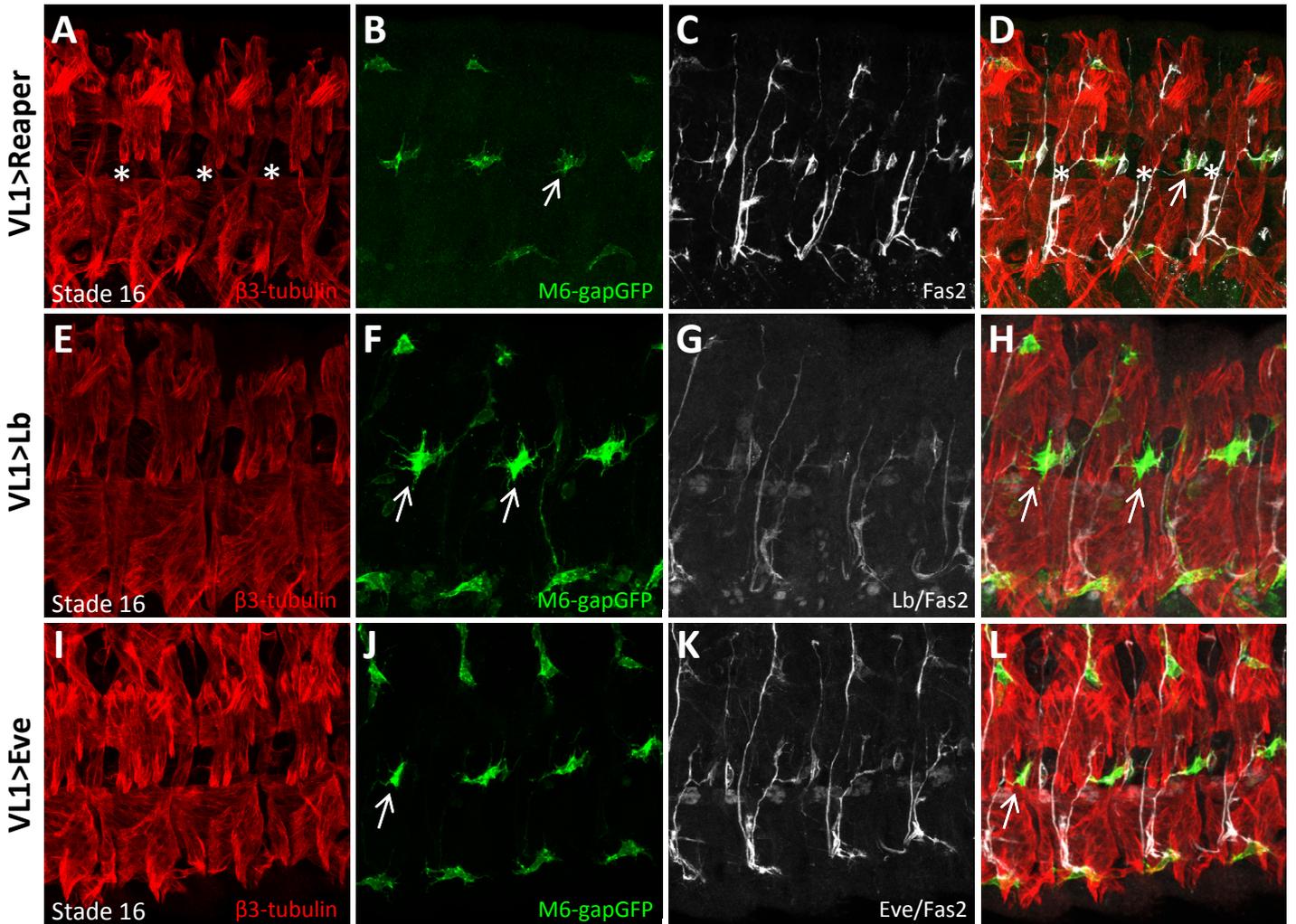


Figure 27: Le muscle VL1 est un acteur majeur de la migration des IAMPs

A-L. Vues latérales zoomées d'embryons de stade 16 M6-gapGFP;VL1>Reaper (A-D), M6-gapGFP;VL1>Lb (E-H), et M6-gapGFP;VL1>Eve (I-L). Les muscles sont révélés par un marquage contre la β 3-tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc) associés à des anticorps anti-Lb (E-H) ou anti-Eve (I-L). A-D. Les muscles VL1 sont rentrés en apoptose (astérisques blancs). Les IAMPs ont un comportement migratoire altéré avec une migration sur le muscle LO1 ou une absence de migration (flèches blanches). E-L. L'expression ectopique des gènes d'identité Lb et Eve dans le VL1 est suffisante pour provoquer des défauts de migration des IAMPs (flèches blanches).

n'ont pas un phénotype complètement pénétrant en comparaison avec le pilote Duf-GAL4, mais on observe tout de même des segments avec des IAMPs qui ne migrent pas. Ceci suggère que modifier l'identité du VL1 est suffisant pour affecter les IAMPs.

Prises ensemble, ces données permettent de mettre en évidence que la migration des IAMPs semble avoir une influence sur la mise en place de la L-SNa, probablement par l'orientation des filopodes stabilisant la L-SNa. De plus, cette migration apparaît comme muscle dépendante, principalement via les interactions entre IAMPs et VL1. Cependant, le mécanisme permettant l'attraction des IAMPs reste encore à définir.

V. Caractérisation des AMPs au cours de l'embryogenèse :

Un autre objectif de ce projet a consisté en l'analyse de l'identité des AMPs. En effet, si on sait que ces cellules sont des cellules sœurs des FCs qui resteront quiescentes au cours de l'embryogenèse, très peu d'expériences ont été réalisées sur ces cellules. Au commencement de ce projet, une approche de TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) a été envisagée. Cette méthode consiste en la capture de sous-unités ribosomales marquées par la GFP, ce qui permet d'isoler puis de séquencer les ARNs en cours de traduction. Bien que les AMPs ne représentent pas une forte population de cellules au sein d'un embryon, l'équipe a développé une amélioration de cette technique spécifique pour les populations rares, le rc-TRAP (Bertin *et al.*, 2015). Cependant, la réalisation de cette méthode pour les AMPs s'est heurtée à une difficulté majeure. En effet, le TRAP repose principalement sur l'utilisation du système GAL4/UAS pour cibler dans le tissu d'intérêt l'expression de la sous-unité RPL10A-GFP. Dans le cas des AMPs, seul le pilote M6-GAL4 était disponible, et ce dernier présente une expression ectopique dans de nombreux tissus tels que le CNS ou les cellules péricardiaques. Afin de réduire au maximum l'expression ectopique du pilote M6-GAL4, des lignées associant ce pilote avec l'expression de l'inhibiteur GAL80 directement sous le contrôle d'une région régulatrice du gène *elav*, ciblant le CNS, ont été construites. Malheureusement, aucune lignée suffisamment stable n'a pu être établie au cours de ce projet, forçant ainsi l'abandon de la méthode TRAP. Une autre approche consistant à disséquer les régions régulatrices des gènes *Him*, *E(spl)m6* et *Bib* a été mise en place. Les résultats ne sont pas présentés ici car aucune des régions isolées n'a permis d'aboutir à l'obtention d'un pilote ne ciblant que les AMPs ou ayant une expression

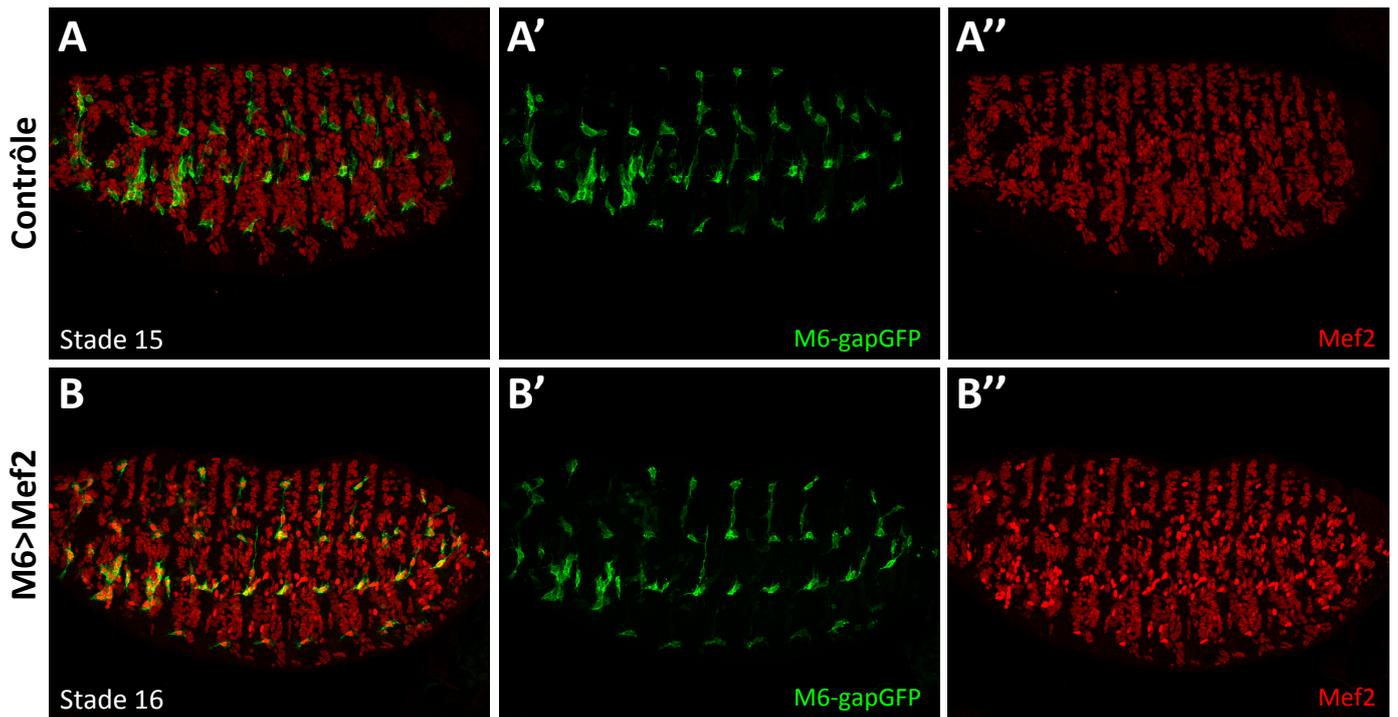


Figure 28: La surexpression de Mef2 dans les AMPs n'a pas d'effet sur leur comportement

Vues latérales d'embryons contrôle M6-gapGFP de stade 15 (A-A'') et M6-gapGFP;M6>Mef2 de stade 16 (B-B''). Les embryons sont marqués par un anticorps anti-GFP (en vert) et un anticorps anti-Mef2 (en rouge). A-A''. Les AMPs n'expriment pas le facteur de transcription myogénique Mef2. B-B''. La surexpression de Mef2 dans les AMPs ne provoque pas de changement de comportement ou de début de différenciation musculaire.

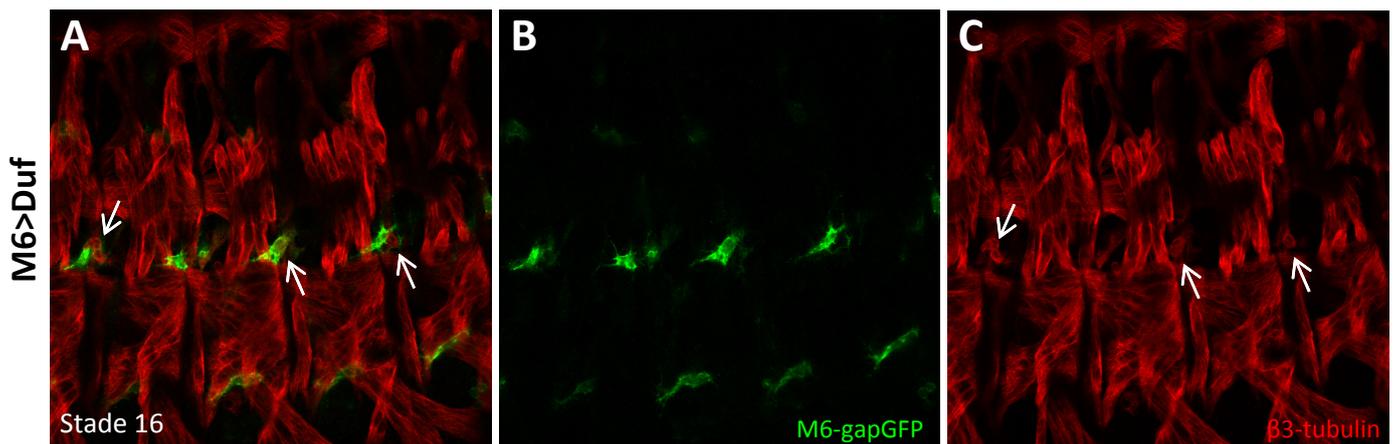


Figure 29: La surexpression de Duf dans les AMPs n'est pas suffisante pour entrainer la formation de nouvelles fibres musculaires

A-C. Vue latérale zoomée d'un embryon de stade 16 M6-gapGFP;M6>Duf. Les muscles sont révélés par un marquage contre la β 3-tubulin (en rouge), et les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert). L'expression de Duf dans les AMPs entraîne l'accumulation de myoblastes compétents à la fusion (FCMs) au niveau des AMPs (flèches blanches). Ce contact n'est cependant pas suffisant pour induire la fusion entre AMPs et FCMs.

ectopique restreinte. Sans la possibilité d'obtenir le transcriptome des AMPs, des approches de génétique plus classiques utilisant le pilote M6-GAL4 ont tout de même été réalisées.

1. Différences entre FCs et AMPs :

L'observation de l'expression d'un marqueur de différenciation musculaire par les vAMPs dans des embryons mutants pour *spi* soulève la question du potentiel de ces cellules à former des muscles. En effet, bien que les AMPs soient des cellules dormantes et non-différenciées au cours de l'embryogenèse, les AMPs et les FCs partagent une origine commune. Il est donc intéressant de comprendre quelles sont les différences entre ces deux types cellulaires mais aussi s'il est possible de modifier le destin des AMPs en celui de FCs. Une des différences majeures se trouve dans la capacité des FCs à fusionner avec les FCMs. Parmi les candidats responsables de cette différence, on sait que l'activation de la voie N n'est pas suffisante puisque l'utilisation d'un dominant négatif de la voie N dans les AMPs n'affecte pas leur comportement (Aradhya *et al.*, 2015). Un autre candidat est l'un des régulateurs majeurs de la fusion et de la formation des fibres musculaires, le facteur de transcription Mef2. On sait que les AMPs n'expriment pas Mef2, probablement sous l'action des répresseurs Him et Zfh1. Lorsque l'on force l'expression de Mef2 dans les AMPs (Figure 28), ce n'est pas suffisant pour amorcer des événements de fusion ou une différenciation des AMPs. En effet, il est possible que l'antagonisme de Him avec l'activité de Mef2 soit suffisant pour bloquer la fusion (Soler et Taylor, 2009). Une autre hypothèse serait que les AMPs ne sont pas capables d'attirer les FCMs. Dans ce sens, l'expression dans les AMPs de la protéine d'adhérence Duf, spécifique des FCs et nécessaire à l'initiation de la fusion, a été réalisée (Figure 29). Bien que cette expression ne soit encore une fois pas suffisante pour déclencher un programme de fusion, cette fois on observe bien la présence de FCMs non fusionnés en contact avec les AMPs. L'objectif sera maintenant de pouvoir associer l'expression de Mef2 et celle de Duf simultanément afin d'observer l'effet sur la capacité des AMPs à former des fibres embryonnaires. Malheureusement, une telle expérience n'a pas encore été mise en œuvre.

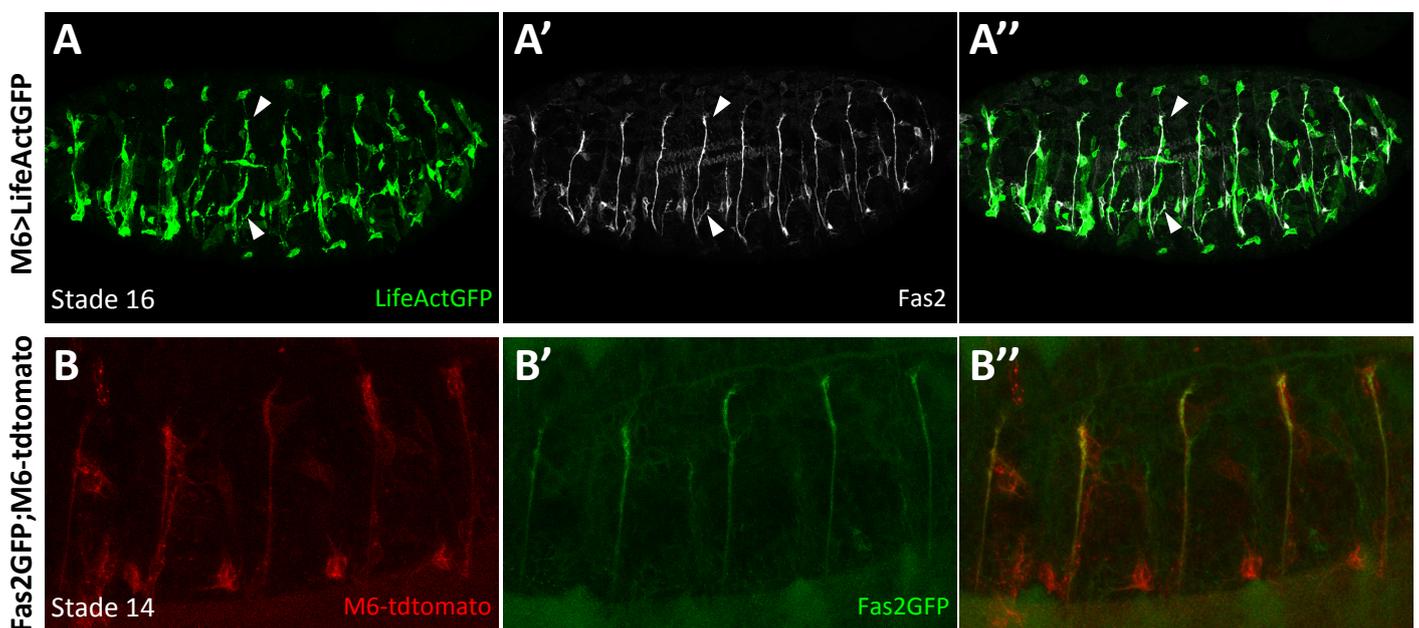


Figure 30: Le pilote M6 est exprimé dans le système nerveux moteur

A-A''. Vue latérale d'un embryon de stade 16 M6>LifeactGFP. L'expression de la LifeActinGFP est révélée par un marquage GFP (en vert) et les axones moteurs sont marqués par un anticorps anti-Fas2 (en blanc). On observe une co-localisation des deux marquages, particulièrement marquée au niveau des cônes de croissance des axones moteurs (tête de flèches blanches). **B-B''**. Vue latérale zoomée *in vivo* d'un embryon de stade 14 Fas2-GFP^{Mue397};M6-tdtomato. Les axones moteurs révélés par la GFP (en vert), co-localisent avec les projections observées avec le transgène M6-tdtomato (en rouge).

2. Migration et dynamique des filopodes des AMPs :

Une autre partie de ce projet consistait en l'analyse des mécanismes et du rôle des filopodes et de la migration des AMPs. Tout d'abord, la visualisation des AMPs par le senseur M6-gapGFP a permis de mieux caractériser les connexions filopodiales des AMPs (résultats publiés dans Aradhya *et al.*, 2015). En plus du rôle des filopodes des dAMPs dans l'établissement du contact avec l'ISN, les projections cytoplasmiques entre dIAMPs et dAMPs assurent leur interconnexion en fin d'embryogenèse. Dans la région latérale, les filopodes des IAMPs entrent en contact avec les muscles, mais aussi avec les axones moteurs de la SNa. Cette nouvelle observation concernant les IAMPs corrige celle faite avec l'utilisation du pilote M6-GAL4 qui suggérait leur connexion avec vAMPs (Figeac *et al.*, 2010). Cette apparente connexion est due à l'expression du pilote M6-GAL4 dans les MNs permettant la visualisation de la SNa. Cette observation est démontrée ici par la co-localisation de la LifeActinGFP dirigée par le pilote M6-GAL4 avec un marquage contre les axones moteurs utilisant l'anticorps anti-Fas2 (Fig. 30). L'observation *in vivo* d'une lignée Fas2GFP associée à l'expression du transgène M6-Tomato a permis encore une fois de constater l'expression de la région régulatrice M6 dans les axones moteurs. Dans un deuxième temps, des expériences ciblant des acteurs impliqués dans la dynamique de l'actine ont été réalisées afin d'affecter la formation des filopodes ou encore la migration des AMPs. Néanmoins, il s'est révélé très difficile d'obtenir des résultats concluants. Malgré l'utilisation d'outils couramment employés pour affecter la dynamique de l'actine tels que les formes dominantes négatives des petites GTPases Rho1, Cdc42 ou Rac1, qui sont connues pour agir notamment sur l'activation des nucléateurs de l'actine, pas ou peu de phénotypes sont visibles au niveau de des AMPs. Différents RNAi ciblant les nucléateurs d'actine ou leurs partenaires ont aussi été employés, mais encore une fois aucun phénotype visible n'a pu être observé. Cependant, bien que le cytosquelette d'actine soit un acteur majeur du comportement cellulaire, de nombreuses autres protéines peuvent aussi être impliquées. C'est le cas des Métalloprotéases de la Matrice (MMPs) impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Chez la drosophile, il existe 2 MMPs : MMP1, qui est sécrétée, et MMP2, maintenue à la membrane par une ancre GPI. L'immunomarquage de ces deux protéines révèle que MMP2 n'est pas exprimée dans les AMPs mais MMP1 apparaît comme exprimée spécifiquement par les IAMPs à partir du stade 15 (Figure 31). Malheureusement, la

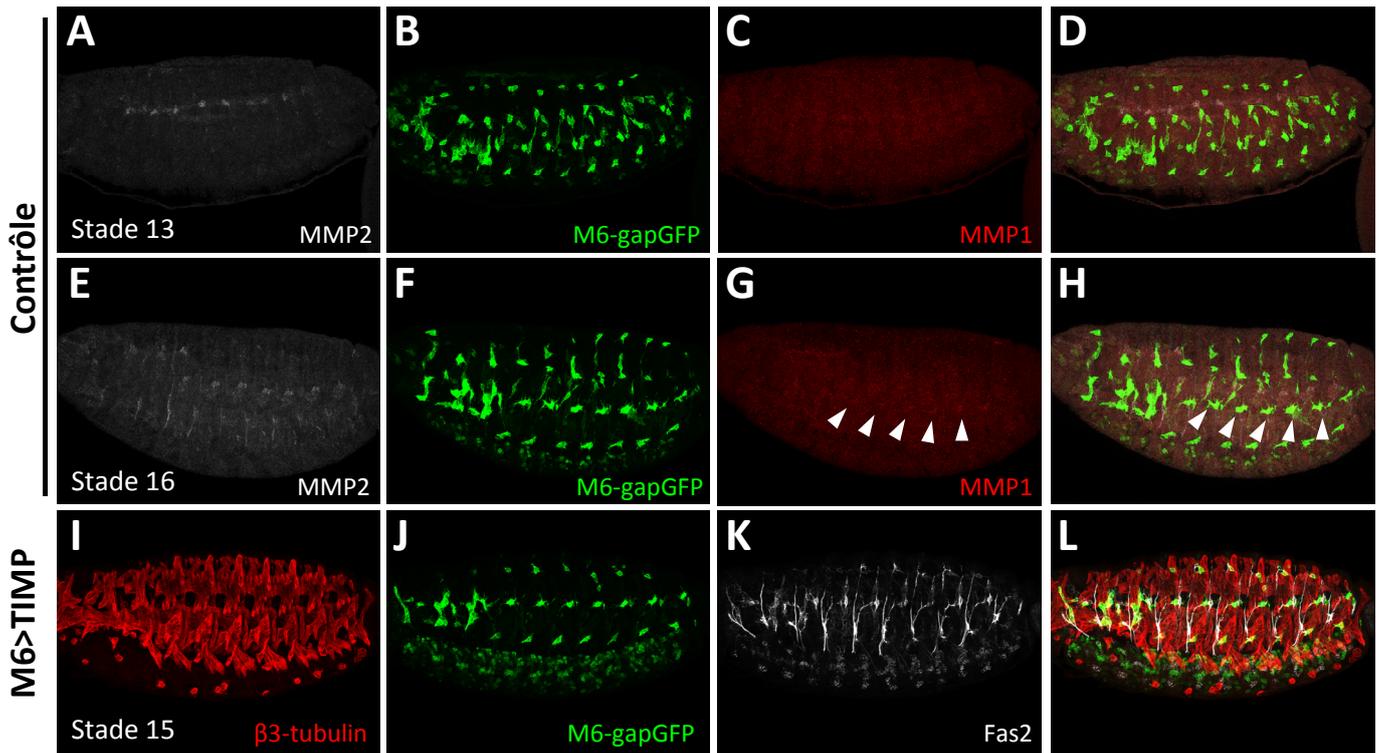


Figure 31: Les IAMPs expriment MMP1 mais son inhibition n’influence pas leur comportement

A-H. Vues latérales d’embryons contrôle M6-gapGFP de stade 13 (**A-D**) et stade 16 (**E-H**). Les embryons sont marqués avec des anticorps contre MMP2 (en blanc), la GFP (en vert), et MMP1 (en rouge). Au stade 13 on observe une absence de co-localisation entre les AMPs et les MMPs. Le marquage MMP2 semble révéler les trachées à ce stade. Au stade 16, on observe une légère expression de MMP1 spécifiquement dans les IAMPs (têtes de flèches blanches). **I-J.** Vue latérale d’un embryon de stade 15 M6-gapGFP;M6>TIMP. Les muscles sont révélés par un marquage contre la β 3-tubulin (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par des anticorps anti-Fas2 (en blanc). L’expression de l’inhibiteur des MMPs par les AMPs ne modifie pas leur comportement.

surexpression dans les AMPs de l'inhibiteur des MMPs, TIMP (Tissu Inhibitor of Metalloproteinases), ne perturbe pas la migration ou la formation des filopodes des IAMPs. Ainsi, le rôle de MMP1 semble difficile à appréhender. Néanmoins, il est intéressant de constater que les mouches adultes exprimant TIMP grâce au pilote M6-GAL4 présentent un phénotype *held out wing* (Zaffran *et al.*, 1997) qui est caractéristique d'un défaut musculaire. Cette observation suggère que l'inhibition des MMPs affecte la formation des muscles adultes. Bien que des relations entre muscle squelettique et MMPs soient déjà connues chez les vertébrés (voir revue Chen et Li, 2009), aucune étude n'a été réalisée chez la drosophile.

3. Analyse de l'expression et du rôle de *bib* dans les AMPs :

Une dernière partie de ce projet s'est orientée sur la caractérisation du rôle des gènes exprimés par les AMPs. Ainsi, certains comme *Fas2*, *unc-5* et *zfh1* ont déjà été abordés car ces derniers sont souvent associés à l'innervation. Cependant, un autre gène exprimé dans les AMPs n'a été que très peu étudié. Il s'agit du gène neurogénique *big brain (bib)*. Comme présenté en introduction, il s'agit d'un gène complexe codant pour une protéine dont la fonction exacte reste encore inconnue. Son expression n'a quant à elle été que peu détaillée. Un immunomarquage de Bib a été effectué afin de mieux comprendre comment l'expression de ce gène évolue au cours du développement du mésoderme (Figure 32). On observe donc que Bib est tout d'abord exprimé dans l'ensemble du mésoderme. Puis ce dernier se restreint aux cellules exprimant fortement Twi dans le domaine ventral, et au mésoderme cardiaque en partie dorsale. A partir du stade 13, Bib n'est présent que dans les AMPs et dans les cellules péricardiaques. Il est intéressant de constater qu'à des stades plus tardifs on observe une expression de Bib différentielle selon le type d'AMPs. On retrouve une forte expression de Bib uniquement dans les AMPs dorso-latérales, latérales et thoraciques. Cet immunomarquage illustre encore une fois les différences entre les sous-populations d'AMPs. De plus, malgré le fait que ce gène ait été rapporté comme exprimé par les AMPs, aucune étude de son rôle au cours de l'embryogenèse autre que son effet neurogénique n'a été entreprise. En observant des embryons mutants pour *bib*, on retrouve bien ce phénotype neurogénique consistant entre autres en un développement anormal du système nerveux central (Figure 33). Cependant, bien que le mésoderme soit fortement affecté, en se concentrant sur l'expression de gènes d'identité tel que Lb, il est possible

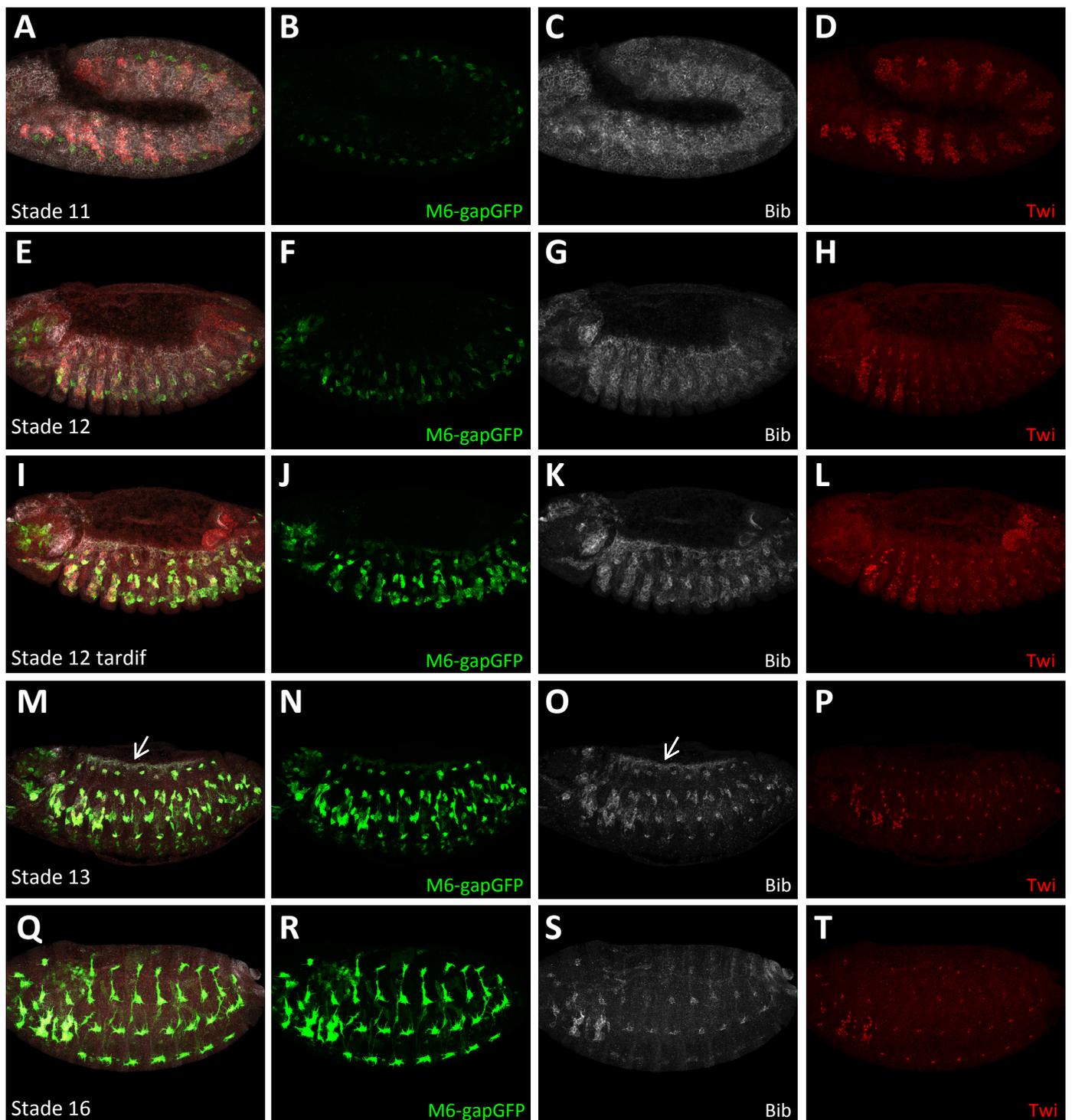


Figure 32: Profil d'expression de Bib au cours de l'embryogenèse

Vue latérale d'embryons M6-GAL4;M6-gapGFP de stades 11 à 16 marqués avec des anticorps anti-Bib (en blanc), anti-Twi (en rouge) et anti-GFP (en vert) (A-T). L'expression de Bib est tout d'abord généralisée dans le mésoderme (A-H), puis commence à se restreindre aux cellules Twist positives et au mésoderme cardiaque à partir de la fin du stade 12 (I-L). Au stade 13, Bib n'est plus exprimé que par les AMPs et les cellules péricardiaques (Flèches blanches, M-P). Au sein même des AMPs, l'expression de Bib devient restreinte aux AMPs thoraciques, IAMPs et dIAMPs à partir du stade 16 (Q-T).

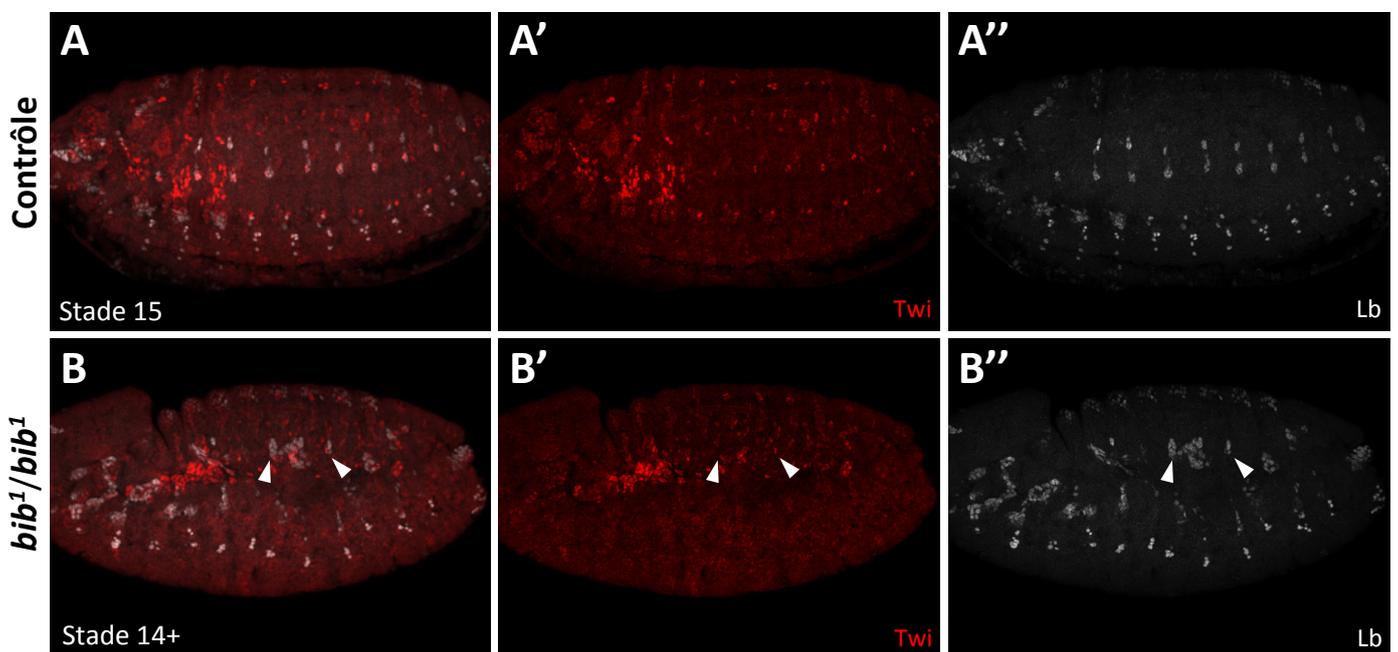


Figure 33: L'absence de Bib n'est pas suffisante pour bloquer la spécification des IAMPs

Vue latérale d'embryons contrôle w^{1118} de stade 15 (A-A''), ou mutant pour le gène *bib* (B-B''), marqués avec des anticorps dirigés contre Twi (en rouge) et le facteur d'identité Lb (en blanc). B-B''. Le phénotype neurogénique est clairement visible avec une expansion du système nerveux central au détriment du mésoderme. La formation des muscles est fortement perturbée mais on peut observer la spécification de cellules Lb positives correspondant au muscle SBM. A ces cellules sont associées des cellules Twi positives exprimant aussi Lb correspondant aux IAMPs (tête de flèche blanche).

d'observer la formation d'un nombre réduit de muscles. Dans ce contexte, on constate que si le PC a pu être sélectionné, les deux populations FC et AMPs sont spécifiées. En prenant comme exemple la région latérale, on observe dans 2 segments la formation d'une fibre musculaire Lb positive, correspondant au SBM, associée à 2 cellules Twi et Lb positives caractéristiques des IAMPs. Ainsi, on peut conclure que *bib* n'est pas impliqué dans la spécification des AMPs. Il n'est en revanche pas possible d'analyser l'effet de la mutation nulle de *bib* sur le comportement des AMPs. Pour cela, des expériences de RNAi et CRISPR/Cas9 inductible ont été réalisées mais n'ont pas conduit à une diminution de la quantité de protéine Bib. En parallèle, le maintien de Bib dans le mésoderme avec le pilote Twist-GAL4 a été effectué mais n'entraîne pas de défaut au niveau de la paroi musculaire.

VI. Impact de l'absence de la SNa sur les AMPs au stade larvaire :

S'il est établi que les AMPs et le système nerveux moteur sont étroitement liés, le rôle de cette connexion n'est pas encore parfaitement défini. Les AMPs sont donc capables d'attirer le système nerveux au cours de l'embryogenèse, et utiliseront ce dernier comme support de migration après leur réactivation. Néanmoins, le rôle du système nerveux comme acteur de la niche des AMPs avant leur réactivation reste encore à déterminer. Les expériences d'apoptose dans la paroi musculaire suggèrent que les AMPs peuvent survivre en absence de muscles lorsqu'elles sont associées au système nerveux. Ainsi, il est possible d'envisager que le système nerveux moteur joue aussi un rôle dans la survie des AMPs. Afin de pouvoir tester cette hypothèse, nous avons exploité un contexte génétique déjà introduit qui est l'expression ectopique de NetB dans l'ensemble des muscles. Il en résulte une absence de formation de la SNa dans une majorité des segments (Figure 24). De plus, ce contexte présente l'avantage d'être viable au stade larvaire contrairement aux mutants *propero*. L'analyse de la région latérale de larves Duf>NetB de 3^{ème} stade a permis de confirmer l'absence de L-SNa au niveau du muscle SBM (Figure 34). Ce phénotype est accompagné d'une disparition du groupe de cellules IAMPs antérieures normalement associées au SBM et à la L-SNa. Cette absence de L-SNa n'a en revanche aucun effet sur le groupe postérieur. Ce premier résultat s'oriente vers un potentiel rôle des nerfs avant la réactivation des AMPs. Cependant ceci reste à confirmer car il n'a pas encore été déterminé si les cellules IAMPs antérieures rentrent en apoptose ou bien migrent à une autre position. De plus, la

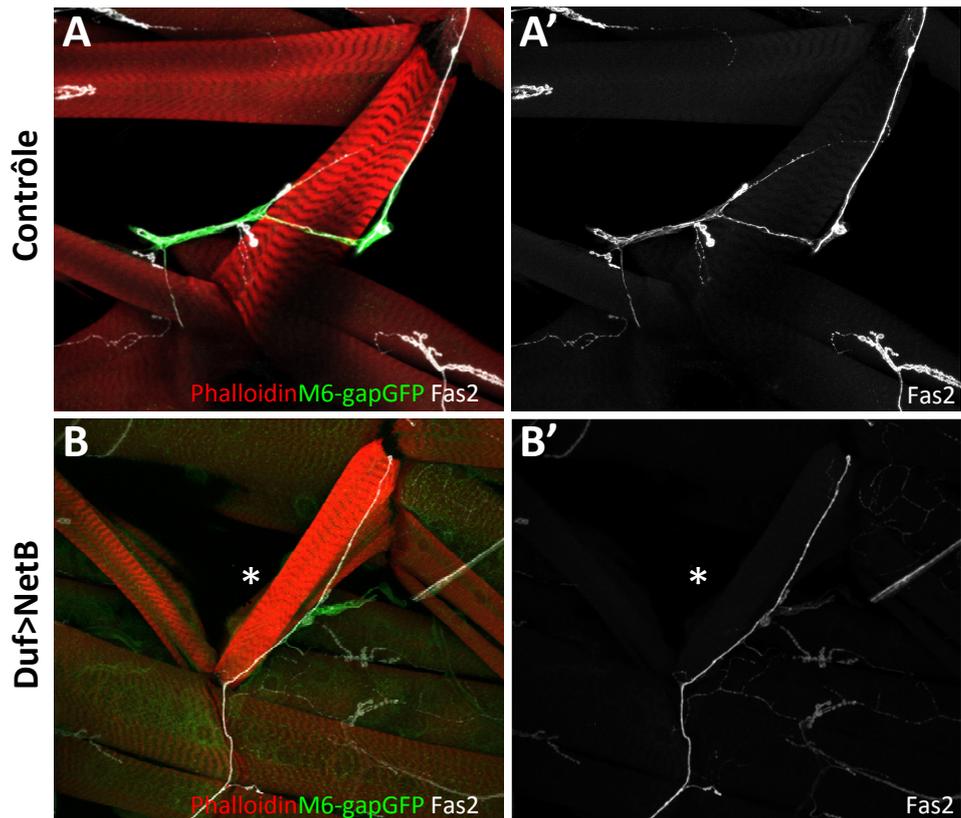


Figure 34: L'absence de L-SNa entraîne une perte des IAMPs antérieures au 3^{ème} stade larvaire

Vue zoomée de la région latérale du SBM au 3^{ème} stade larvaire dans une larve contrôle M6-gapGFP ou affectée M6-gapGFP;Duf>NetB. Les muscle sont révélés par la phalloïdine (en rouge), les AMPs par le transgène M6-gapGFP (en vert), et le système nerveux moteur par un marquage anti-Fas2 (en blanc). A ce stade les deux IAMPs embryonnaires sont réparties de part et d'autre du SBM et ont commencé à se diviser. Les IAMPs antérieures restent étroitement associées à la L-SNa innervant le SBM (A). La surexpression de NetB par les muscles entraîne un blocage et une absence de la Sna (B). L'absence de la SNa est associée à une perte des IAMPs antérieurs (astérisques blancs), alors que les IAMPs postérieures ne sont pas affectées.

surexpression de NetB peut aussi elle-même avoir un effet sur les IAMPs à cause de l'expression de Unc-5. Afin de confirmer ce résultat, il sera nécessaire d'utiliser des larves de stade plus précoce afin d'observer les IAMPs avant leur réactivation. Il est aussi important de trouver d'autres contextes permettant d'observer une perte de L-SNa. On peut envisager l'utilisation d'une lignée pilote BarH1/H2 précédemment décrite pour son expression dans les MNs de la SNa afin d'induire l'apoptose spécifique de ces MNs (Garces *et al.*, 2006).

Discussion

Cette étude sur les interactions entre les AMPs et leur environnement au cours de l'embryogenèse caractérise pour la première fois le rôle des AMPs dans la mise en place de l'innervation des muscles. Jusqu'ici, l'hypothèse que les AMPs joueraient un rôle de « point de contrôle » pour les axones moteurs durant leur navigation n'était basée que sur la description de leurs positions. L'analyse des défauts de localisation des AMPs a permis de mettre en évidence leur capacité d'attraction des branches ISN par les AMPs dorsales et dorso-latérales, et SNa par les AMPs latérales. Non seulement ces cellules souches musculaires attirent le système nerveux, mais dans le cas de la région latérale elles sont responsables de la formation de la branche latérale de la SNa qui innerve les muscles SBM et, plus tardivement, LO1. Ceci permet entre autres de raffiner les observations établies dans l'étude présentée dans Landgraf *et al.*, 1999, qui stipulait que les AMPs n'étaient pas impliquées dans la défasciculation des branches nerveuses. Ce rôle dans le branchement reste cependant spécifique aux IAMPs car l'absence de dAMPs ou de dIAMPs n'influence pas la capacité de l'ISN à innerver les muscles dorsaux. Le mécanisme sous-jacent à l'établissement des contacts entre AMPs et axones a aussi été mis évidence grâce à l'observation de l'activité filopodiale orientée des AMPs qui permet d'établir un contact avec les cônes de croissance des branches nerveuses. Pour les IAMPs, le contact entre filopodes des AMPs et SNa apparaît comme crucial dans l'établissement du futur point de branchement, et dans la formation et la stabilisation de la ISNa. Dans le cas de l'ISN, ce sont les filopodes des dAMPs qui semblent impliqués dans son attraction, même s'il reste surprenant de ne pas observer de défauts de trajectoire lorsque les dAMPs sont absentes. Une hypothèse pourrait être que cette absence est compensée par l'expression de molécules de guidance par les muscles et/ou le système nerveux sensoriel, présents à ce niveau. Néanmoins, le fait que ces AMPs même délocalisées retiennent cette capacité d'attraction est intéressant car cela semble indiquer que l'interaction avec le système nerveux soit nécessaire aux AMPs. Ceci est en corrélation avec la relation étroite qu'entretiennent ces deux tissus après la réactivation des AMPs dans les stades larvaires tardifs (Curie et Bate, 1991). Même si cette étude a permis d'établir l'importance des AMPs dans la guidance des axones, les mécanismes moléculaires permettant cette attraction restent encore à définir.

I. Acteurs impliqués dans la guidance des axones par les AMPs :

La découverte de l'expression de *Sidestep* dans les IAMPs permet de faire un premier pas dans la compréhension de ces mécanismes. En effet, le phénotype de la perte de fonction de *sidestep* est identique à celui de la perte des IAMPs, avec une absence totale de ISNa. Le SBM et le VL1 ne semblant pas exprimer *Sidestep* dans la région latérale, les IAMPs sont le meilleur candidat pour expliquer ce phénotype. Malheureusement, il n'a pas été possible de mettre en place des expériences de sauvetage à cause de l'expression ectopique du pilote M6-GAL4. Des expériences de RNAi sont en cours mais risquent de prendre du temps à analyser en prenant en compte le manque d'efficacité du RNAi dans les AMPs, mais aussi la faible pénétrance de la perte de L-SNa dans les mutants *sidestep*. Le fait que la perte de *sidestep* n'entraîne pas une disparition complète de la ISNa suggère fortement un mécanisme de compensation par d'autres molécules possédant une fonction redondante. Ces acteurs sont encore à déterminer mais l'étude récente de l'expression des familles *Beats* et *Sides* semble prometteuse dans ce sens (Li *et al.*, 2017). Non seulement il a pu être déterminé que *Sidestep VI* est présent au niveau d'une des dIAMPs, mais il est aussi possible que cette étude ait eu une mauvaise interprétation sur l'expression d'un autre candidat, *Sidestep IV*. En effet, l'hybridation *in situ* de l'ARN de *side IV* révèle sa présence dans la région latérale. En revanche, cette expression a été associée aux muscles LO1 et SBM. En observant l'image présentée en Figure 6D (Li *et al.*, 2017), cette localisation semble plutôt correspondre aux IAMPs (mais aussi aux vAMPs dans la région ventrale). Afin de confirmer cette hypothèse, une nouvelle expérience d'hybridation *in situ* devra être réalisée. Qu'il s'agisse de l'expression de *Sidestep VI* dans une dIAMP ou de l'expression de *Side* dans les IAMPs, ces données mettent aussi en avant la différence qui existe entre les AMPs.

II. Vers une identité des AMPs :

Ainsi, il devient évident que les AMPs ne sont pas équivalentes, et possèdent une identité propre. On peut retrouver ces différences au sein même de populations d'AMPs partageant une position similaire. Par exemple, dans les mouvements au cours de l'embryogenèse avec la migration d'une seule dIAMP vers la dAMP et d'une IAMP le long du VL1, ou encore dans l'expression différentielle de différents marqueurs tels que *Sidestep VI* ou l'iTF Kr exprimés uniquement dans la IAMP antérieure (Figeac *et al.*, 2010). De même, on a aussi été montré

que l'ablation d'AMPs en larve peut être compensée par d'autres AMPs mais seulement si ces dernières proviennent d'une position similaire dans un segment adjacent (Farrell et Keshishian, 1999). Une caractéristique que partagent les AMPs et les FCs est l'expression d'iTFs, mais le rôle de ces iTFs dans les AMPs n'a pas encore été exploré. Ces iTFs pourraient permettre l'acquisition d'une identité positionnelle des AMPs. Un véritable code d'iTFs pour les AMPs n'a pas encore été découvert, mais on connaît déjà cinq iTFs qui ont été identifiés avec Lb, Kr et Org-1 dans les IAMPs, S59 dans la vAMP et Islet dans une dIAMP. Afin de commencer à analyser le rôle de ces iTFs, l'expression Kr, Lb et S59 avec le pilote M6-GAL4 a été réalisée. L'analyse de ces surexpressions n'a pas permis de d'observer un effet de ces iTFs sur le comportement des AMPs au cours du développement embryonnaire. L'expression de Kr dans la IAMP antérieure représentait pourtant un excellent candidat pour expliquer la différence de comportement entre les deux IAMPs. Malheureusement, l'expression forcée de Kr dans la IAMP postérieure n'est pas suffisante pour modifier son programme et entraîner une migration sur le VL1 comme la IAMP antérieure. Cependant, ces expériences ont été analysées uniquement au cours de l'embryogenèse. Il est possible que les iTFs soient nécessaires après la réactivation des AMPs. De plus, la grande majorité des croisements d'iTFs avec le pilote M6-GAL4 présentent une létalité au stade pupal. L'étude aux stades larvaire et pupal de ces surexpressions d'iTFs permettra de déterminer s'ils ont un impact sur la migration des AMPs le long des axones, ou encore sur la prolifération et formation des fibres musculaires adultes.

III. Caractérisation du rôle des gènes exprimés par les AMPs :

On connaît de plus en plus de gènes exprimés dans les AMPs, cependant leurs fonctions dans ces cellules n'ont pas ou très peu été étudiées. Dans la plupart des cas, seule l'expression a été rapportée sans pour autant mettre en évidence leurs rôles. Au cours de ce projet, nous avons commencé à mettre en place l'étude de ces marqueurs. Cependant, la faible efficacité des méthodes d'inactivation de gènes au cours de l'embryogenèse (RNAi, CRISPRs inducible) rend leur analyse plus complexe. Pour l'instant seule l'étude de mutants a pu être réalisée sans pour autant apporter des réponses claires sur l'effet de ces gènes.

Dans le cas de la molécule d'adhésion Fas2, elle ne semble pas réellement impliquée dans le comportement des AMPs et ne pourrait qu'être présente pour faciliter la reconnaissance

entre le système nerveux et les AMPs. Dans ce sens, le marquage réalisé avec un anticorps sema-2b marquant principalement le système nerveux sensoriel n'est pas idéal. Malheureusement, le seul anticorps fiable qui aurait permis de suivre spécifiquement les axones moteurs dV-GLUT n'était pas accessible (Mahr et Aberle, 2006). Il sera intéressant de vérifier si le trajet des axones moteurs peut légèrement dévier au niveau des AMPs en cas d'absence de Fas2, comme c'est le cas dans les mutants *side* avec une déviation de l'ISN par rapport aux axones sensoriels (Siebert *et al.*, 2009).

Un autre gène candidat lors de cette étude a été le facteur de transcription *zfh1*, ce gène est retrouvé dans de nombreux tissus durant l'embryogenèse. Il est notamment impliqué dans la guidance via l'expression de molécules d'adhérence et d'attraction/répulsion, et comme répresseur de Mef2. Cependant son rôle dans les AMPs reste à déterminer. Même si la perte de fonction de *zfh1* semble affecter la spécification et la localisation des AMPs, il est complexe de déterminer si ces effets sont dus à l'expression de *zfh1* dans le mésoderme ou dans les AMPs. Cependant, l'analyse des mutants aurait pu révéler un potentiel rôle de *zfh1* exprimé par les AMPs dans la guidance des axones moteurs (Layden *et al.*, 2006). Mais, comme il l'a été montré dans les résultats, la mutation *zfh1*⁵ présente un phénotype bien plus drastique sur la SNa et sur les AMPs qu'il ne l'a été décrit dans la littérature. Il est aujourd'hui impossible d'expliquer cette différence observée et il sera nécessaire de tester d'autres allèles mutants pour *zfh1* afin de pouvoir analyser son effet.

Parmi les cibles connues de Zfh1, on retrouve le récepteur Unc-5. La découverte de l'expression de ce récepteur par les AMPs est basée sur une étude de ChIPs sur Twist et l'effecteur de la voie N Suppressor of Hairless (Su(H)). Ces expériences ont été réalisées sur des cellules DMD8 qui sont des AMPs réactivées immortalisées (Bernard *et al.*, 2010). Le gène *unc-5* fait partie des quelques gènes qui présentent sur leurs régions régulatrices une fixation de Twi et de Su(H) dans ces cellules. Ces résultats ont conduit à la recherche bibliographique qui a permis d'identifier et de réinterpréter la lignée rapportrice Unc-5GHGFP. Les cellules AMPs ont un rôle dans l'attraction du système nerveux, et le récepteur Unc-5 est connu pour son implication dans la guidance des axones moteurs. A partir de ces données, il a été émis l'hypothèse que le récepteur Unc-5 exprimé par les AMPs pourrait jouer un rôle dans les phénotypes de l'ISN et de la SNa décrits pour les mutants *unc-5*. Cependant, l'analyse des mutants *unc-5* couplée à la visualisation des AMPs, ne semble pas

indiquer un rôle des AMPs dans les défauts d'innervation observés. Les arrêts de migration de l'ISN ou encore les franchissements de bordure de segments ne sont pas associés à des défauts de présence ou de comportement des AMPs dorsales ou dorso-latérales. Il existe tout de même quelques défauts de migration des IAMPs qui restent encore à caractériser plus en détail.

Le dernier gène analysé a été le gène neurogénique *bib*, mais le fort phénotype causé par sa mutation rend l'analyse délicate. Malgré les études qui ont déjà été effectuées sur ce gène, sa fonction réelle reste encore évasive. L'observation des mutants a néanmoins permis de déterminer que *bib* ne semble pas impliqué dans la spécification des cellules AMPs, puisque lorsque le SBM est correctement formé, il reste accompagné de deux cellules IAMPs. En effet, le raffinement progressif de l'expression de *Bib* aurait pu suggérer un rôle dans la division asymétrique des PCs. Cependant, cette expression spécifique de *bib* au niveau des AMPs est intrigante et laisse supposer une fonction de ce gène dans les AMPs. Il a aussi été vérifié que son expression n'était pas simplement due à l'activation de la voie N dans les AMPs. Pour cela, nous avons confirmé que l'expression de NICD dans le mésoderme n'était pas suffisante pour activer l'expression de *bib*.

IV. Effet des voies de signalisation majeures sur les AMPs :

Une autre approche qui n'a pas été mentionnée dans les résultats a été l'étude de l'impact de l'activation et de l'inhibition des voies de signalisation dans les AMPs grâce au pilote M6-GAL4. Cette approche a consisté en l'expression ectopique dans les AMPs de molécules activatrices et répressives des voies de signalisation Wg, EGF, FGF, Hippo et Dpp. Une lignée rapportrice de la voie JAK/STAT a aussi été analysée mais n'a pas révélé d'activation de cette voie dans les AMPs. Cette étude avait pour objectif de tester l'effet de ces voies sur la survie ou sur la quiescence des AMPs. Une des hypothèses de départ était aussi basée sur la possibilité que l'activité filopodiale des AMPs puisse être liée à ces voies de signalisation comme c'est le cas pour les cytonèmes (Roy *et al.*, 2014) qui ont par ailleurs déjà été décrits dans des AMPs réactivées du disque d'aile (Huang et Kornberg, 2015). Cependant, et d'une façon surprenante, ces contextes génétiques avec des voies de signalisation activées ou réprimées n'ont pas eu d'effet sur les AMPs au cours de l'embryogenèse. Ces résultats restent concordant avec les observations montrant que l'étude de l'expression de dominants

négatifs des voies insuline et N dans les AMPs, connues comme étant impliquées dans la réactivation des AMPs au stade larvaire, n'ont pas d'effet encore une fois au cours de l'embryogenèse (Aradhya *et al.*, 2015).

V. Un nouveau rôle pour Unc-5 :

Lors des expériences consistant en l'expression de la molécule d'adhésion Duf par les AMPs via le pilote M6-GAL4, il a été montré que les cellules AMPs deviennent capables d'attirer les FCMs sans pour autant s'engager dans un processus de fusion. Il est important de préciser que même si dans certains cas les AMPs peuvent attirer les FCMs, ces événements sont plutôt rares. Cette observation suggère un potentiel mécanisme interférant sur le contact entre AMPs et FCMs. Cette hypothèse est aussi basée sur une étude qui a montré que le récepteur Unc-5 serait capable d'interagir avec Stick and stones (Sns) (Ozkan *et al.*, 2013), mais cette potentielle interaction n'a encore jamais été étudiée *in vivo*. Le fait que Sns soit exprimé par les FCMs et que le récepteur Unc-5 soit un récepteur principalement associé à la répulsion, permet de supposer que Unc-5 présent dans les AMPs puisse être capable d'entraîner la répulsion des FCMs. Afin de tester cette hypothèse, une surexpression de Unc-5 a été effectuée dans les FCs avec le pilote Duf-GAL4. Les résultats montrent l'apparition de défauts de fusion conduisant à l'observation de fibres musculaires plus fines mais aussi à la présence de FCMs non fusionnés dans des embryons de stade 16 où le processus de fusion est normalement terminé. Ainsi, Unc-5 semble bien pouvoir interagir avec sns. Il est possible qu'un des rôles de Unc-5 dans les AMPs soit d'assurer une répulsion des FCMs durant les étapes de fusion, même s'il a été montré que le simple contact AMP/FCM est loin d'être suffisant pour fusionner. Pour confirmer ces résultats, il sera nécessaire d'analyser l'effet de l'expression de Duf dans les AMPs dans un contexte mutant pour Unc-5.

VI. Interactions entre les IAMPs et les muscles :

A l'origine, l'étude du dialogue entre les cellules souches musculaires dormantes et les muscles était au centre de ce projet de thèse. En effet, ce projet fait suite à la découverte du rôle protecteur des muscles au cours de l'embryogenèse, mais aussi de leur importance dans la réactivation de AMPs par la sécrétion de dILP6 (Aradhya *et al.*, 2015). Cependant, l'étude des relations entre ces deux tissus s'est révélée très complexe à mettre en place. L'une des

pistes suivies était le rôle éventuel des filopodes des AMPs qui permettraient de communiquer avec les muscles adjacents. Si cette hypothèse n'a pu être vérifiée, il a tout de même été observé que certains des filopodes des AMPs en contact avec des fibres musculaires apparaissent comme stabilisés. D'un autre côté, l'analyse de la migration de la IAMP antérieure a permis de mettre en évidence les interactions entre cette cellule et le muscle VL1 qui lui sert de support. Cette migration semble mettre en jeu un dialogue entre muscle et AMP via des contacts directs médiés notamment par les filopodes de l'AMP mais aussi du muscle. Ces projections cytoplasmiques musculaires ne sont pas sans rappeler les myopodes, précédemment décrits comme impliqués dans l'établissement des contacts muscle/axones moteurs (Ritzenthaler *et al.*, 2000). De plus, ces myopodes ont principalement été analysés au niveau du muscle VL1, révélant l'importance de la protéine de la famille des LRR Capricious (Caps) dans la guidance terminale des axones (Kohsaka et Nose, 2009). Il est donc envisageable qu'un mécanisme similaire soit mis en jeu dans l'attraction de la IAMP antérieure avec l'implication de Caps dans les contacts IAMP/VL1.

Matériel et méthodes

I. Liste des lignées :

L'ensemble des lignées, ainsi que des croisements, ont été maintenus à 25°C. Les lignées rapportrices M6-gapGFP (Aradhya *et al.*, 2015) et M6-tdTomato (cette étude) ont été générées au laboratoire. Les lignées M6-GAL4;M6-gapGFP, Duf-GAL4;M6-gapGFP, Twist-GAL4 et w^{1118} ont été utilisées comme contrôles dans les différentes expériences. Les lignées inductrices suivantes ont été utilisées : M6-GAL4 (Figeac *et al.*, 2010), Duf-GAL4 (K. Vijayraghavan), Twist-GAL4 (M. Frasch), SBM-GAL4 (Figeac *et al.*, 2010), Lms-GAL4 (Janelia 46861), VL1-GAL4 (A. Nose), et S59-GAL4 (M. Frasch). Ces lignées ont été associées aux lignées inductibles : UAS-Reaper (BL5824), UAS-NICD (M. Grammond), UAS-S59 (M. Frasch), UAS-NetB (T. Kidd), UAS-Sema-2aGFP (BL65747), UAS-Eve (M. Frasch), UAS-Ap (P. Heitzler), UAS-Col (A. Vincent), UAS-Lb (Jagla *et al.*, 1998), UAS-Poxm (M. Noll), UAS-Kr (D. Brentrup), UAS-LifeActinGFP (BL58718), UAS-Duf (M. Ruiz-Gomez) et UAS-TIMP (BL58708). Les lignées mutantes employées sont : ths^{759} (BL77474), htl^{AB42} (BL5370), spi^1 (BL1859), $unc-5^8$ (J.P. Labrador), bib^1 (Y. N. Yan) et $zfh1^5$ (A. Garces).

II. Anticorps utilisés :

Espèce	Anticorps	Provenance	Dilution
Souris	Bib	Y. N. Yan	1 : 200
Cochon d'inde	Twi	R. Zinzen	1 : 1000
Chèvre	GFP	Abcam, ab 5450	1 : 1000
Souris	Fas2	Developmental Studies Hybridoma Bank (1D4)	1 : 400
Rat	Eve	D. Kosman	1 : 200
Lapin	β 3-tubulin	R. Renkawitz-Pohl	1 : 4000
Lapin	Mef2	H. Nguyen	1 : 1000
Souris	Sema-2b	J. Luginbuhl	1 : 1000
Souris	Lb	Jagla <i>et al.</i> , 1997	1 : 1000
Souris	MMP1	Developmental Studies Hybridoma Bank (3A6B4/3B8D12)	1 : 10
Souris	MMP2	K. Broadie	1 : 100
-	Phalloidin-TRITC	Sigma	1 : 1000

III. Article 2 : Characterization of Drosophila Muscle Stem Cell-Like Adult Muscle Precursors :

Les protocoles utilisés au cours de ce projet ont fait l'objet d'une publication technique dans le journal *Methods in Molecular Biology* – Springer.

Characterization of *Drosophila* muscle stem cell-like adult muscle precursors

Guillaume Lavergne, Cedric Soler, Monika Zmojdzian and * Krzysztof Jagla

*GReD (Genetics, Reproduction and Development laboratory), INSERM 1103, CNRS 6293,
University of Clermont-Ferrand, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France*

* author for correspondence: christophe.jagla@udamail.fr

Summary

Uncovering how muscle stem cells behave in quiescent and activated states is central to understand the basic rules governing normal muscle development and regeneration in pathological conditions. Specification of mesodermal lineages including muscle stem-like adult muscle precursors (AMPs) has been extensively studied in *Drosophila* providing an attractive framework for investigating muscle stem cell properties. Restricted number of AMP cells, relative ease in following their behavior and large number of genetic tools available make fruit fly an attractive model system for studying muscle stem cells. In this chapter we describe the recently developed tools to visualize and target the body wall and imaginal AMPs.

Keywords

Drosophila; adult muscle precursors (AMPs); muscle stem cell; muscle development; imaging

1. Introduction

The development of *Drosophila* muscles is a complex process leading *in fine* to the formation of adult fly musculature. Two distinct waves of myogenesis take place during the life cycle of *Drosophila*. The first embryonic wave leads to the formation of larval body wall muscles and to specification of a small population of myoblasts called Adult Muscle Precursors (aPs/AMPs) that keep an undifferentiated state and share several features with vertebrate muscle stem cells [1] ; [2].

Two populations of AMPs can be distinguished: abdominal AMPs and thoracic AMPs. They differ by their anatomical position and the adult muscle type they give rise to. In the thoracic segments the AMPs gather in cluster of 6 to 7 ventrally located cells associated with the primordia of imaginal discs. In each abdominal hemisegment 6 AMPs are present in a stereotyped pattern of one dorsal, two dorso-lateral, two lateral and one ventral AMP (Fig. 1). The specified abdominal AMPs stay in close vicinity of specific muscle fibers and are characterized by the persistent expression of the basic helix-loop-helix transcription factor Twist [3] and the activation of the Notch pathway. The cooperation between Notch and Twist results in the expression of two known repressors of muscle differentiation: Holes in muscle (Him) [4] and Zinc finger homeodomain 1 (Zfh1) [5].

We took advantage from the fact that the Notch pathway is active in AMPs by using the Notch-responsive element of *E(spl)M6* gene to drive membrane-targeted GFP and to follow AMP cells *in vivo*. We observed that the embryonic AMPs send long cellular processes, which make AMPs interconnected [6] but also short filopodia that make them connected to the surrounding muscles (Fig. 2). The capacity to produce cellular protrusions and make connections has also been described for quiescent satellite cells sitting on muscle fibers [7]. Thus, studying AMPs in

embryos could provide insights into how muscle stem cells recognize their muscle niche and how stem cell homing process is regulated.

On the other hand, in middle of the second larval instar, the quiescent AMPs get reactivated and start to proliferate to generate a pool of myoblasts required for the second wave of myogenesis and the formation of adult fly muscles. Accordingly, abdominal AMPs are at the origin of all the adult abdominal muscles whereas thoracic AMPs associated with wing and leg imaginal discs give rise to flight and leg muscles [3]. Studying reactivation of AMPs and their exit from the quiescent state could help in understanding how homologous processes are regulated in vertebrate muscle stem cells. Here we provide some tips to detect AMPs at the onset of their reactivation in second instar larva (Fig. 3).

As mentioned above, in the thoracic segments, most AMPs are associated with wing and leg imaginal discs. These cells, known as imaginal myoblasts or ad epithelial cells give rise to flight and leg muscles [3]. In both type of discs, imaginal myoblasts reside at precise positions [3];[8]. For instance in wing imaginal discs, they are positioned in the notum part of disc since the second instar. Most of thoracic muscles, including leg muscles, direct flight muscles (DFM) and the dorso ventral indirect flight muscles (DVMs) are formed *de novo*. However, a subset of indirect flight muscles (IFMs), the dorsal longitudinal muscles (DLMs), uses larval templates for development [9]; [10]. The DLMs are formed by a regeneration-like process consisting of fusion of imaginal AMPs from the wing disc with persisting larval oblique muscles (LOMs). This leads to remodeling of the three LOMs into six adult DLMs. Thus, like mammalian satellite cells, the AMPs contribute to the regeneration and remodeling of pre-existing muscles.

Various genes are expressed in myoblasts associated with imaginal discs, sometimes long before they start to differentiate, and could thus be used as their markers. Several genes are expressed in all ad epithelial cells. This is the case of Twist, maintained in all AMPs from

embryonic stages, and Mef2 [3]; [11]. Mef2 is expressed from late third instar but its activity is restrained until several hours after pupae formation by its inhibitor Him [4]; [12]. Many genes, such as *cut*, *vestigial*, *scalloped* or *ladybird*, involved in muscle specification in the embryo are used again to specify adult muscle precursors [13]; [14]; [15]; [16]. These genes are differentially expressed in myoblasts associated to leg and wing discs, and mark the distinct subsets of thoracic AMPs (Fig. 4).

Taken together, the described characteristics of AMPs illustrate the diversity of myogenic processes to which they contribute through *Drosophila* development. Below we provide a set of tools that allow to visualize and to target the AMPs during embryogenesis and during larval stages.

2. Materials

2.1. *Drosophila* stocks:

The embryonic/larval AMP sensor line M6-gapGFP and the driver M6-GAL4 were generated in our lab [6]. Note that many useful *Drosophila* lines are already available at Bloomington Drosophila Stock Center.

2.2. Embryo collection and dechoriation

1. Egg collection cages: 100 mL plastic beakers with pierced holes on the top attached to freshly prepared small plastic Petri dishes plated with grape juice (50% grape juice, 2.5% agar) and covered with yeast paste (dry baker's yeast mixed with water till obtaining a paste consistency).

2. Plastic baskets prepared from cut-off 15 mL falcon tubes with Nitex[®] mesh screwed by a cap cut in the center to allow embryo collection.
3. 3% commercial bleach.
4. Paint brushes and distilled water in squirt bottle.

2.3. *In vivo* imaging of embryonic AMPs

1. Dissecting microscope.
2. Agar (50% grape juice, 5% agar), needles with handle.
3. Technau glue: Heptane/glue mix.
4. 22x40 mm coverslips.
5. Halocarbon oil (Voltalef 10S).

2.4. Larvae dissection

1. Dissecting microscope.
2. Sylgard[®] dish and 3 well glass dish.
3. Dissection solution: Phosphate-buffered saline (PBS 1X, pH 7.4) with 25 mM EDTA.
4. Insect pins[®] 0.2 mm diameter (Fine Science Tools).
5. Sharp forceps (Dumont #55) and scissors (Fine Science Tools).

2.5. Immunostaining of embryonic and larval AMPs

1. Fixative solutions:

4% Formaldehyde, 80 mM PIPES pH7.4, 1.6 mM EGTA, 0.8 mM MgSO₄ (modified 4%)

FA

4% Formaldehyde in PBS 1X (4% FA)

4% paraformaldehyde in PBS 1X (4% PFA)

2. Heptane, Methanol and Ethanol.
3. Rocking platform.
4. PBS 1X, pH 7.4.
5. 0.01% Triton-X-100 PBS 1X (0.01% PBT).
6. 0,1% Triton-X-100 PBS 1X (0.1% PBT).
7. 0,5% Triton-X-100 PBS 1X (0.5% PBT).
8. Blocking solution: 10% Horse serum in PBT.
9. Fluoromount-G[®] mounting medium.

2.6. Detection and markers of AMPs

2.6.1. Expression of fluorescent proteins

A common way for expressing a variety of fluorescent proteins in a tissue-specific manner is to use the GAL4/UAS system [17]. For visualization of AMPs we dispose of several tools relying on this system. We developed a new M6-GAL4 line [6] driving expression of UAS reporters specifically in all embryonic AMPs till the end of the third larval instar. While M6-GAL4 expression is decreasing, other lines can be used to follow larval AMPs. The 1151-GAL4 line is the most common line used for driving expression of fluorescent protein in imaginal myoblasts [18]; [8]. As this driver does not drive expression during embryogenesis it is also useful for expressing any molecule without affecting embryonic development. Other known Gal4

driver lines can be used such as 24B-Gal4 and Mef2-Gal4 [19]; [20] to follow myogenic progression of myoblasts derived from AMPs. Fluorescent proteins expressed in imaginal myoblasts can be visualized on living or fixed discs without performing any immunostaining. On the contrary, an immunostaining is required to visualize fluorescent proteins in fixed preparation of embryos due to the alcohol-based fixation method.

2.6.2. Markers of embryonic AMPs

Expression of several genes can be used to selectively mark the various types of adult muscle precursors at each stage of development (listed in table 1). During embryogenesis AMPs are characterized by the expression of Twist (Twi), which is the most common marker used to visualize them. Shared markers of embryonic AMPs also include the transcription factors Cut [6] and Zfh1 [21] as well as the Mef2 inhibitor Him [4]. However, AMPs are a heterogeneous population as illustrated by the expression of different identity genes in specific AMPs subpopulations. Within the abdominal segments, the AMPs display differential expression of identity markers depending on their dorsal-ventral position. The lateral AMPs express the transcription factors Ladybird (Lb) [15] and Krüppel (Kr) [22] [6] whereas the ventral AMPs express Slouch (Slou) and Pox meso [23]; [24]. Starting from the embryonic stage 12, a subpopulation of thoracic AMPs that expresses Vestigial (Vg) can also be distinguished [13].

2.6.3. Markers of imaginal myoblasts associated with leg and wing discs

Twist expression is maintained in all AMPs, including imaginal myoblasts, and is detectable in both leg and wing discs associated myoblasts until several hours after pupae formation [3]. Mef2, a key factor of differentiation in embryo and adult myogenesis, is first expressed from very late third instar and is maintained until adult stages [11]; [25]; [26]. Embryonic identity genes are also required in adult muscle diversification and can be used as specific markers to detect different populations of AMPs associated with imaginal discs. In wing disc two populations of AMPs are distinguishable, Vestigial (Vg) and low levels of Cut are expressed in myoblasts giving rise to the IFMs, whereas myoblasts required for DFM development show a high levels of Cut but no Vg [13]. In leg disc, Vg is expressed in a small subset of myoblasts associated with the dorsal proximal region and very likely participating to thoracic flight muscle. Other leg myoblasts expressing a high level of Cut [14]; (Fig. 4A-C) are at the origin of all leg muscles. We also found that Ladybird early (Lbe) [15], an orthologue of Lbx1, a key regulator of appendicular myogenesis in vertebrates [27], is expressed in leg myoblasts. Lbe is initially detected at early third instar in a small subset of leg myoblasts, and then its expression extends progressively to all myoblasts (except most proximal myoblasts expressing Vg). However, dorsal myoblasts are characterized by a lower level of Lbe expression compared to ventral myoblasts [14]; (Fig. 4D-F).

3. Methods

3.1. Embryo collection and dechorionization

1. Setup the cross in fly food vial with about 40 females and 10-20 males for 2 days at 25°C, then transfer the flies to the egg collection cage.
2. Collect embryos after overnight eggs laying.
3. Transfer embryos into a plastic basket using distilled water and a paintbrush. Then wash with distilled water to remove yeast paste residuals.
4. Proceed to dechoronation by transferring the basket containing embryos into a 3% bleach solution for 3 min. Ensure that embryos are well immerse during this step. Dechorionated embryos should float on the surface (*see note 1*).
5. Thoroughly rinse the embryos with distilled water. Place the basket on a paper towel to absorb water prior to perform in vivo confocal microscopy (see **subheading 3.3.**) or immunostaining (*see subheading 3.5.*).

3.2. 2nd and 3rd instar larvae collection

Proper staging of larvae is critical for the accuracy of following experiments, especially when studying reactivation of AMPs. Here we describe an easy way to ensure the recovery of staged larvae.

1. Setup the cross as mentioned in **subheading 3.1., step 1** (e.g. for the weekend).
2. The day of eggs collection: synchronize the eggs laying by changing the plates 2-3 times with two hours interval.
3. Collect the plates with embryos after 2 hours of laying (T0-T2).

4. Allow the embryos to develop at 25°C.
5. To ensure proper staging of larvae, at 22 hours from T0 remove all hatched larvae.
6. At 24 hours from T0 collect all hatched larvae (first larval instar, first larval day) and put on a fresh plate enriched in yeast / fly food *.
7. Allow the larvae to develop for 66 hours at 25°C.
8. After 72 to 96 hours (96 h-120 h from T0) collect the larvae (3rd instar) for imaginal disc staining (see **Subheading 3.5.**) or larva body wall staining (see **Subheading 3.6.**).

* For 2nd instar larvae

7. Allow the larvae to develop for 26 hours at 25°C.
8. After 26 hours (50 h from T0) collect the larva (beginning of 2nd instar, second larval day) for dissection.

3.3. *In vivo* confocal microscopy of embryonic AMPs

One of the advantages of *Drosophila* model is the possibility to easily follow embryonic development by live imaging. Nevertheless special care should be taken with the choice of fluorescent proteins and settings when performing *in vivo* confocal microscopy (see **note 2**).

1. Transfer the dechorionated embryos with a paintbrush onto a slice of agar laid on a glass slide.
2. Under a dissecting microscope, use a needle with handle to carefully align embryos of the desired stage (see **note 3**).

3. Spread a drop of heptane/glue on the surface of a 22x40 mm coverslip and let it dry. Transfer the embryos on the coverslip by delicately pressing the coverslip on the slice of agar.
4. Cover the embryos with Voltalef 10S oil.
5. Embryos are ready for live imaging.

3.4. Embryo immunostaining

The protocol presented below is routinely used in our lab for most of immunostaining procedure. Please note that in some specific cases, some steps should be adapted (see **notes 4-5**).

1. Prepare a mix of 600 μ L of Heptane and 600 μ L of fixative solution (modified 4% FA) in a 1.5 mL eppendorf tube (see **note 4**).
2. Transfer the dechorionated embryos with a paintbrush in the heptane/fixative solution.
3. Incubate for 20 min at room temperature on a rocking device.
4. After fixation, carefully remove the lower phase leaving only the embryos in the heptane phase. Add 600 μ L of methanol and shake vigorously during 4 min (*see note 5*).
5. Let the embryos settle and carefully remove the heptane and methanol phases. Embryos which stay between the two phases did not popped out their vitelline membrane and should be discarded.
6. Wash two times with methanol by letting embryos sink at the bottom of the tube and discard the methanol.
7. Wash one time in ethanol 100%. At this stage dehydrated embryos can be stored in ethanol 100% for several months at -20°C.

8. Prior to immunostaining, embryos need to be rehydrated using ethanol/0.1% PBT series. Incubate embryos in ethanol 70%, then in ethanol 50% and finally in ethanol 30% for 5 min each, at room temperature on a rocking device.
9. Rinse three times for 5 min with 0.1% PBT at room temperature on a rocking device.
10. Remove the 0.1% PBT and block non-specific protein binding sites by adding the blocking solution (10% horse serum in 0.1% PBT) for at least 1h at room temperature on a rocking device.
11. Remove the blocking solution and add primary antibodies at recommended concentration in blocking solution (*see note 6*).
12. Incubate overnight at 4°C on a rocking device.
13. Wash with 0.1% PBT quickly two times and then three times for 10 min on a rocking device.
14. Remove the 0.1% PBT and add appropriate secondary antibodies at recommended concentration in blocking solution. If secondary antibody is conjugated to light sensitive compound keep the sample in the dark from this step.
15. Incubate 2 h at room temperature on a rocking device.
16. Repeat **step 13**, then transfer embryos on slide in a drop of Fluoromount-G[®] mounting medium using a cut-off pipet cone.

3.5. Imaginal disc immunostaining

The following protocol describes the immunostaining of imaginal discs of third instar larvae, for pupal stage discs some precautions should be taken (*see note 8*). All steps of fixation, blocking, washing and antibody incubations are performed on a rocking device.

1. Collect 3rd instar larvae with a paintbrush (see **note 8**).
2. Transfer collected larvae to a 3 well clear glass dish filled with PBS 1X.
3. Pre-dissection: using forceps cut the larvae in half and invert the anterior section (inside tissue outside), remove trachea and fat body.
4. Transfer inverted sections into 1,5 mL eppendorf tube filled with fixative solution (4% PFA) and incubate for 20 to 30 min at room temperature on a rocking device (see **note 8**).
5. Rinse three times for 10 min with PBT 0.5% at room temperature.
6. Remove the 0.5% PBT and add the blocking solution (10% horse serum in 0.5% PBT) for at least 1h at room temperature.
7. Remove the blocking solution and add primary antibodies at recommended concentration.
8. Incubate overnight at 4°C.
9. Rinse three times with 0,5% PBT for 10 min.
10. Add appropriate secondary antibodies diluted in blocking solution.
11. Incubate 2 h at room temperature.
12. Rinse three times for 10 min with PBS 1X.
13. Transfer immunostained sections back into 3 well glass dish filled with PBS 1X.
14. Carefully dissect each disc with fine forceps and transfer them on microscope slide in a drop of Fluoromount-G[®] mounting medium.

3.6. 2nd and 3rd instar larvae immunostaining

To detect/visualize AMP cells in 2nd and 3rd instar larvae we use M6-gapGFP individuals which are dissected as described below and then stained with anti-GFP and/or anti-Twist antibodies. Muscle pattern is revealed using Phalloidin staining (see Fig. 3).

1. Put the larva of the desired stage on a Sylgard[®] dish.
2. Using the forceps pin the larva with the small pins in the anterior end and posterior end keeping the dorsal side up.
3. Pour the larva with a drop of dissection solution (PBS containing 25 mM EDTA) and with sharp scissors incise the body wall close to the posterior end and open the larva to the anterior end.
4. Using the forceps gently remove all internal tissue (intestine, fat body, salivary gland etc.).
5. Incise finely the body wall close to the pins and using the forceps pin the body wall making it flat.
6. Remove the brain and remaining tissues.
7. Rinse the larva in dissection solution.
8. Remove the remaining dissection solution and add the fixative solution (4% FA) for 20 min at room temperature.
9. Remove the fixation solution and rinse in 0.01% PBT
10. Transfer the dissected larva into 1,5 mL eppendorf tube. Up to 5 dissected larvae can be pooled at this step.
11. Rinse three times for 5 min at room temperature.
12. Incubate the tissue in blocking solution (10% horse serum in 0.01% PBT) for 30 min at room temperature.
13. Incubate in primary antibody diluted in blocking solution at 4°C overnight.
14. Rinse three times with 0.01% PBT for 10min at room temperature.
15. Incubate in secondary antibody diluted with 0.01% PBT for 2 hours at room temperature.

16. Repeat **step 12**.
17. If needed to visualize body wall muscles – incubate with Phalloidin, diluted in 0.01% PBT for 20 min at room temperature in the dark.
18. Repeat **step 12** then mount on a slide in Fluoromount-G[®] mounting medium (*see note 7*).

4. Notes

1. Proper removal of the chorion can be observed under a dissecting microscope. Exceeding 3 min of bleach exposure can affect normal architecture of the embryos.
2. Photobleaching during *in vivo* confocal imaging can occur when applying high laser power, high resolution and low speed scanning settings.
3. Experienced manipulator can easily recognize the different embryo stages under a dissecting microscope. To facilitate alignment of a defined stage embryos it is also possible to setup short egg-laying window as mentioned in **subheading 3.2., step 2-3** and then let embryos develop until the desired stage is reached.
4. Alternative fixative methods can be applied depending on the antigen targeted. For example for immunostaining of the cytoskeleton, the use of 4% paraformaldehyde, either in PBS or Phosphate Buffer fixative solutions, is recommended.
5. For some staining, like phalloidin, the devitellinisation step requires to avoid the use of methanol. In this case replace the methanol with 90% ethanol and vortex for 1 min.
6. It is recommended to use a minimal volume of 200 μ L when performing immunostaining in 1.5 mL eppendorf tube.
7. When mounting the slide take care to ensure that the body wall muscles are well oriented for proper visualization (e.g. on the upper side for inverted microscope).

8. After pupae formation (APF), dissection of imaginal discs is more delicate. As pupal case is a hard tissue and inside pressure increases with pupae age it is preferable to open the pupae progressively and delicately from its center. After 2 h APF, imaginal discs are not anymore strongly connected to surrounding tissues (e.g.: brain, cuticule...) and they tend to disperse, it is recommended to not transfer the samples into an eppendorf but rather to perform all steps in 3 well clear glass.

Acknowledgments

We wish to thanks all members of the Jagla lab for stimulating discussions. We are grateful to former Jagla lab members: N. Figeac for initial characterization of AMP markers and to R. Aradhya for generating M6-Gal6 and M6-gapGFP lines. This work is supported by the ANR grant ID-CELL-SPE to KJ, the “Equipe” FRM grant to KJ and the AFM-Téléthon grant to GL.

References

1. Ruiz Gomez M, Bate M (1997) Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* 124 (23):4857-4866
2. Figeac N, Daczewska M, Marcelle C, Jagla K (2007) Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236 (12):3332-3342. doi:10.1002/dvdy.21345
3. Bate M, Rushton E, Currie DA (1991) Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113 (1):79-89
4. Liotta D, Han J, Elgar S, Garvey C, Han Z, Taylor MV (2007) The Him gene reveals a balance of inputs controlling muscle differentiation in *Drosophila*. *Current biology : CB* 17 (16):1409-1413. doi:10.1016/j.cub.2007.07.039
5. Postigo AA, Ward E, Skeath JB, Dean DC (1999) *zfh-1*, the *Drosophila* homologue of ZEB, is a transcriptional repressor that regulates somatic myogenesis. *Molecular and cellular biology* 19 (10):7255-7263
6. Figeac N, Jagla T, Aradhya R, Da Ponte JP, Jagla K (2010) *Drosophila* adult muscle precursors form a network of interconnected cells and are specified by the rhomboid-triggered EGF pathway. *Development* 137 (12):1965-1973. doi:10.1242/dev.049080
7. Tavi P, Korhonen T, Hanninen SL, Bruton JD, Loof S, Simon A, Westerblad H (2010) Myogenic skeletal muscle satellite cells communicate by tunnelling nanotubes. *Journal of cellular physiology* 223 (2):376-383. doi:10.1002/jcp.22044
8. Soler C, Daczewska M, Da Ponte JP, Dastugue B, Jagla K (2004) Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development* 131 (24):6041-6051. doi:10.1242/dev.01527

9. Fernandes J, Bate M, Vijayraghavan K (1991) Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* 113 (1):67-77
10. Fernandes JJ, Keshishian H (1996) Patterning the dorsal longitudinal flight muscles (DLM) of *Drosophila*: insights from the ablation of larval scaffolds. *Development* 122 (12):3755-3763
11. Ranganayakulu G, Zhao B, Dokidis A, Molkenin JD, Olson EN, Schulz RA (1995) A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Developmental biology* 171 (1):169-181. doi:10.1006/dbio.1995.1269
12. Soler C, Taylor MV (2009) The Him gene inhibits the development of *Drosophila* flight muscles during metamorphosis. *Mechanisms of development* 126 (7):595-603. doi:10.1016/j.mod.2009.03.003
13. Sudarsan V, Anant S, Guptan P, VijayRaghavan K, Skaer H (2001) Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Developmental cell* 1 (6):829-839
14. Maqbool T, Soler C, Jagla T, Daczewska M, Lodha N, Palliyil S, VijayRaghavan K, Jagla K (2006) Shaping leg muscles in *Drosophila*: role of ladybird, a conserved regulator of appendicular myogenesis. *PloS one* 1:e122. doi:10.1371/journal.pone.0000122
15. Bernard F, Dutriaux A, Silber J, Lalouette A (2006) Notch pathway repression by vestigial is required to promote indirect flight muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 295 (1):164-177. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.022
16. Deng H, Hughes SC, Bell JB, Simmonds AJ (2009) Alternative requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular biology of the cell* 20 (1):256-269. doi:10.1091/mbc.E08-03-0288
17. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118 (2):401-415

18. Anant S, Roy S, VijayRaghavan K (1998) Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*. *Development* 125 (8):1361-1369
19. Fyrberg C, Becker J, Barthmaier P, Mahaffey J, Fyrberg E (1997) A *Drosophila* muscle-specific gene related to the mouse quaking locus. *Gene* 197 (1-2):315-323
20. Ranganayakulu G, Elliott DA, Harvey RP, Olson EN (1998) Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice. *Development* 125 (16):3037-3048
21. Sellin J, Drechsler M, Nguyen HT, Paululat A (2009) Antagonistic function of Lmd and Zfh1 fine tunes cell fate decisions in the Twi and Tin positive mesoderm of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 326 (2):444-455. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.041
22. Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carroll SB (1996) Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382 (6587):133-138. doi:10.1038/382133a0
23. Knirr S, Azpiazu N, Frasch M (1999) The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning. *Development* 126 (20):4525-4535
24. Duan H, Zhang C, Chen J, Sink H, Frei E, Noll M (2007) A key role of Pox meso in somatic myogenesis of *Drosophila*. *Development* 134 (22):3985-3997. doi:10.1242/dev.008821
25. Cripps RM, Olson EN (1998) Twist is required for muscle template splitting during adult *Drosophila* myogenesis. *Developmental biology* 203 (1):106-115. doi:10.1006/dbio.1998.9040
26. Soler C, Han J, Taylor MV (2012) The conserved transcription factor Mef2 has multiple roles in adult *Drosophila* musculature formation. *Development* 139 (7):1270-1275. doi:10.1242/dev.077875
27. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of anatomy* 202 (1):59-68

28. Lilly B, Zhao B, Ranganayakulu G, Paterson BM, Schulz RA, Olson EN(1995) Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267(5198):688-93.

29. Jagla K, Jagla T, Heitzler P, Dretzen G, Bellard F, Bellard M. (1997) ladybird, a tandem of homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the *Drosophila* embryo. *Development* 124(1):91-100.

Figures and table legends

Figure 1. Non-differentiated, muscle-committed fate of AMPs.

(A) Lateral views of stage 13 and (B) stage 15 embryos stained for myogenic factor Twi. Arrowheads point to Twi-positive abdominal adult muscle precursors (6 per hemisegment). DAMP- dorsal AMP; DLAMP – dorso-lateral AMPs; LAMP - lateral AMP; VAMP - ventral AMP. Twi-expressing AMPs are Mef2 negative (C, D) and β 3-Tubuline-negative (arrowheads) indicating their non-differentiated fate.

Figure 2. AMPs send filopodia to contact neighboring muscles.

(A-C) Lateral view of stage 15 M6-gapGFP – AMP-sensor embryo stained for GFP (A) to reveal AMP cell shapes and for β 3-Tubuline to reveal body wall muscle network. (C) A merged view. Arrows point to filopodia that extend from lateral AMPs to contact lateral muscles.

Figure 3. Second larval instar AMPs keep filopodia-based connections with muscles.

Two lateral AMPs revealed by M6-gapGFP sensor are shown (arrows) associated with neighboring SBM - Segment Border Muscle and LO1- Lateral Oblique 1 muscle. Arrowheads point to filopodia extending from the AMP cell bodies and connecting the SBM.

Figure 4. Markers of AMPs associated with leg imaginal discs.

(A-C) Two distinct subsets of leg disc AMPs are detected by Vg and Cut transcription factors. Vg labels AMPs in the stalk region of the disc whereas Cut-positive AMPs are associated with the leg disc proper. (D-F) Twist marks all imaginal AMPs, a subset of which expresses homeodomain transcription factor Lbe.

Table 1. General markers of embryonic and imaginal disc associated AMP cells.

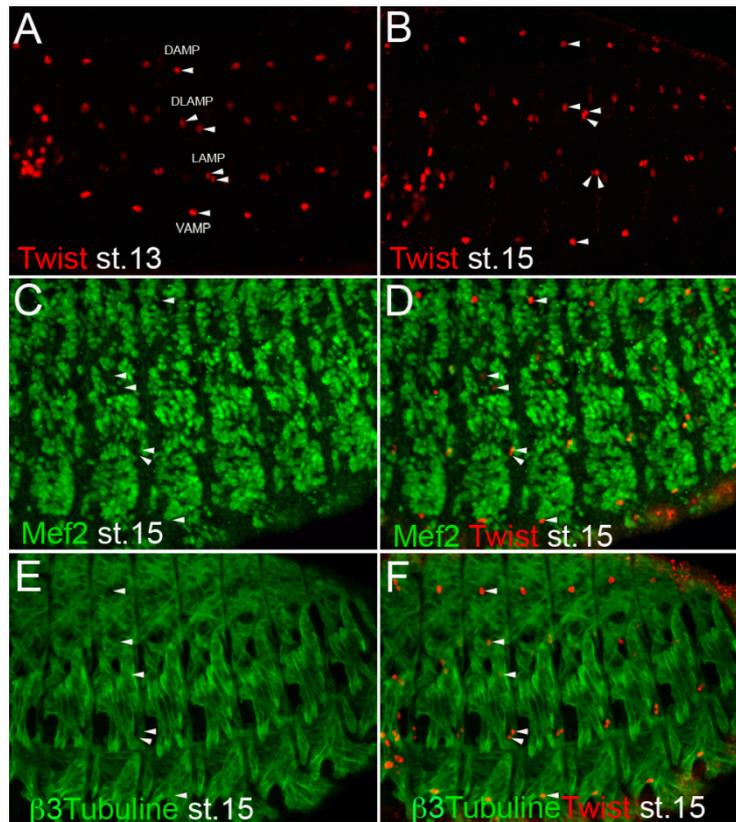


Figure 1. Non-differentiated, muscle-committed fate of AMPs.

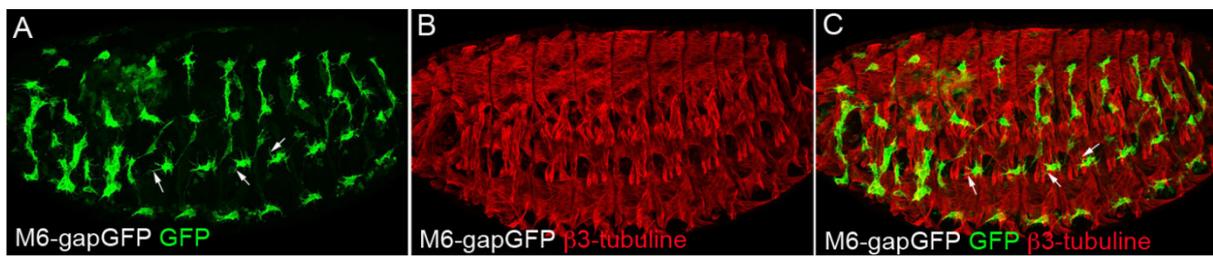


Figure 2. AMPs send filopodia to contact neighboring muscles.

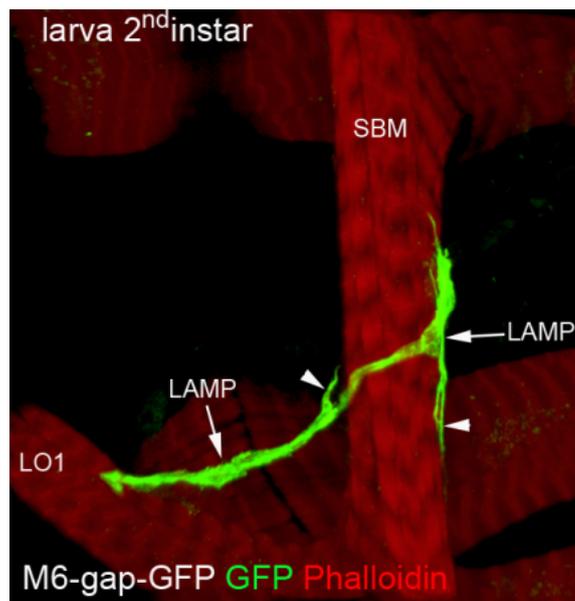


Figure 3. Second larval instar AMPs keep filopodia-based connections with muscles.

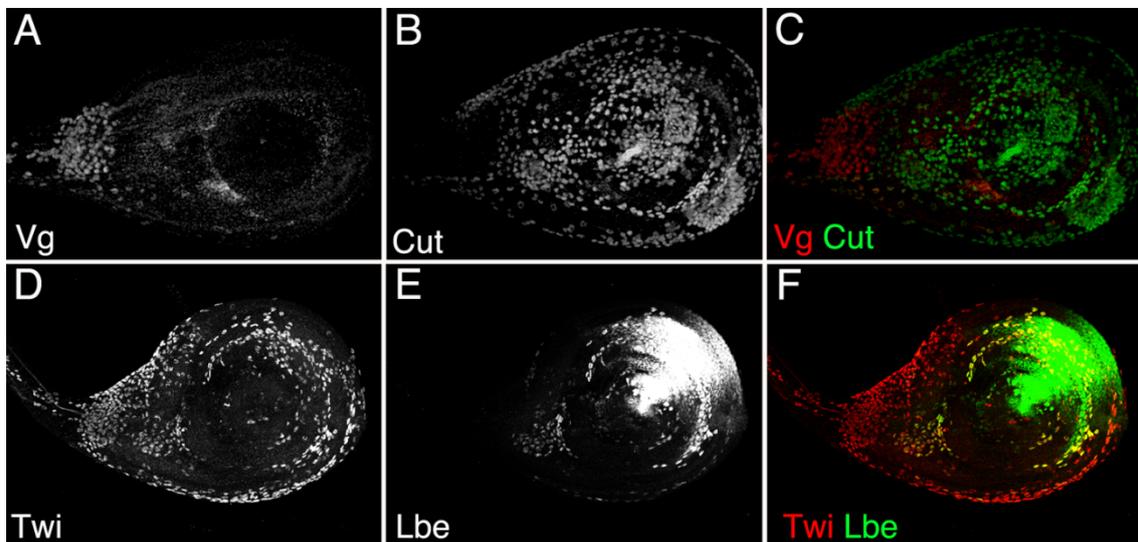


Figure 4. Markers of AMPs associated with leg imaginal discs.

genes	Embryonic AMPs expression	Adepthelial cell expression	vertebrate orthologue	antibody	reference/source
Twist	all AMPs	all AMPs of wing and leg discs	Twist	rabbit (1/500)	Figeac et al 2010
Mef2	not expressed	all AMPs of wing and leg discs	Mef2	rabbit (1/1000)	lilly et al 1995
Vg	subset of thoracic AMPs	in wing disc: large group of proximal AMPs, in leg disc: small group of most proximal AMPs	VGLL	rabbit (1/200)	Kim et al. 1996
Cut	all AMPs	in wing disc: small distal group of AMPs, in leg disc: most AMPs	Cux2	mouse (1/100)	DHSB
Lb	lateral AMPs	all AMPs associated to leg discs (except most proximal region), ventral myoblasts express a higher level than dorsal ones	Lbx	mouse (1/200)	Jagla et al 1997

Table 1. General markers of embryonic and imaginal disc associated AMP cells.

Références bibliographiques

- Abel, T., Michelson, A.M., and Maniatis, T. (1993). A *Drosophila* GATA family member that binds to Adh regulatory sequences is expressed in the developing fat body. *Development* *119*, 623–633.
- Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* *139*, 641–656.
- Abrell, S., and Jäckle, H. (2001). Axon guidance of *Drosophila* SNb motoneurons depends on the cooperative action of muscular Krüppel and neuronal capricious activities. *Mech. Dev.* *109*, 3–12.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* *287*, 2185–2195.
- Anant, S., Roy, S., and VijayRaghavan, K. (1998). Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*. *Development* *125*, 1361–1369.
- Aradhya, R., Zmojdian, M., Da Ponte, J.P., and Jagla, K. (2015). Muscle niche-driven Insulin-Notch-Myc cascade reactivates dormant Adult Muscle Precursors in *Drosophila*. *Elife* *4*.
- Armand, P., Knapp, A.C., Hirsch, A.J., Wieschaus, E.F., and Cole, M.D. (1994). A novel basic helix-loop-helix protein is expressed in muscle attachment sites of the *Drosophila* epidermis. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 4145–4154.
- Arredondo, J.J., Vivar, J., Laine-Menéndez, S., Martínez-Morentin, L., and Cervera, M. (2017). CF2 transcription factor is involved in the regulation of Mef2 RNA levels, nuclei number and muscle fiber size. *PLoS ONE* *12*, e0179194.
- Artero, R.D., Castanon, I., and Baylies, M.K. (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* *128*, 4251–4264.
- Arzan Zarin, A., and Labrador, J.-P. (2017). Motor axon guidance in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Asadzadeh, J., Neligan, N., Canabal-Alvear, J.J., Daly, A.C., Kramer, S.G., and Labrador, J.-P. (2015). The Unc-5 Receptor Is Directly Regulated by Tinman in the Developing *Drosophila* Dorsal Vessel. *PLoS ONE* *10*, e0137688.
- Atreya, K.B., and Fernandes, J.J. (2008). Founder cells regulate fiber number but not fiber formation during adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *321*, 123–140.
- Ayoob, J.C., Terman, J.R., and Kolodkin, A.L. (2006). *Drosophila* Plexin B is a Sema-2a receptor required for axon guidance. *Development* *133*, 2125–2135.
- Azpiazu, N., and Frasch, M. (1993). tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* *7*, 1325–1340.
- Azpiazu, N., Lawrence, P.A., Vincent, J.P., and Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* *10*, 3183–3194.
- Baker, R., and Schubiger, G. (1996). Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development* *122*, 617–626.
- Balagopalan, L., Keller, C.A., and Abmayr, S.M. (2001). Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila* nautilus gene is not essential for embryonic myogenesis or viability. *Dev. Biol.* *231*, 374–382.
- Ball, E.E., Ho, R.K., and Goodman, C.S. (1985). Muscle development in the grasshopper embryo. I. Muscles, nerves, and apodemes in the metathoracic leg. *Dev. Biol.* *111*, 383–398.

Bataillé, L., Delon, I., Da Ponte, J.P., Brown, N.H., and Jagla, K. (2010). Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev. Cell* *19*, 317–328.

Bataillé, L., Boukhatmi, H., Frenedo, J.-L., and Vincent, A. (2017). Dynamics of transcriptional (re)-programming of syncytial nuclei in developing muscles. *BMC Biol.* *15*, 48.

Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* *110*, 791–804.

Bate, M., Rushton, E., and Currie, D.A. (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* *113*, 79–89.

Bate, M., Rushton, E., and Frasch, M. (1993). A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Dev. Suppl.* 149–161.

Baylies, M.K., and Bate, M. (1996). twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* *272*, 1481–1484.

Bate, M. (1993). The mesoderm and its derivatives. In *The development of Drosophila melanogaster*. (Eds. M. Bate and A. Martínez-Arias). Cold Spring Harbor, New York, CSH Laboratory Press, pp. 1013-1090.

Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L., and Volk, T. (1997). Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development* *124*, 2615–2622.

Beckett, K., and Baylies, M.K. (2007). 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev. Biol.* *309*, 113–125.

Beer, J., Technau, G.M., and Campos-Ortega, J.A. (1987). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster* : IV. Commitment and proliferative capabilities of mesodermal cells. *Roux Arch. Dev. Biol.* *196*, 222–230.

Beiman, M., Shilo, B.Z., and Volk, T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* *10*, 2993–3002.

Bernard, F., Dutriaux, A., Silber, J., and Lalouette, A. (2006). Notch pathway repression by vestigial is required to promote indirect flight muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* *295*, 164–177.

Bernard, F., Krejci, A., Housden, B., Adryan, B., and Bray, S.J. (2010). Specificity of Notch pathway activation: twist controls the transcriptional output in adult muscle progenitors. *Development* *137*, 2633–2642.

Bertin, B., Renaud, Y., Aradhya, R., Jagla, K., and Junion, G. (2015). TRAP-rc, Translating Ribosome Affinity Purification from Rare Cell Populations of *Drosophila* Embryos. *J Vis Exp*.

Bischof, J., Björklund, M., Furger, E., Schertel, C., Taipale, J., and Basler, K. (2013). A versatile platform for creating a comprehensive UAS-ORFeome library in *Drosophila*. *Development* *140*, 2434–2442.

Blochlinger, K., Bodmer, R., Jack, J., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1988). Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in *Drosophila*. *Nature* *333*, 629–635.

Bodmer, R. (1993). The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* *118*, 719–729.

Bodmer, R., and Jan, Y.N. (1987). Morphological differentiation of the embryonic peripheral neurons in *Drosophila*. *Roux Arch. Dev. Biol.* *196*, 69–77.

Bodmer, R., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1990). A new homeobox-containing gene, msh-2, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*. *Development* *110*, 661–669.

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.

Borkowski, O.M., Brown, N.H., and Bate, M. (1995). Anterior-posterior subdivision and the diversification of the mesoderm in *Drosophila*. *Development* *121*, 4183–4193.

Bothe, I., and Baylies, M.K. (2016). *Drosophila* myogenesis. *Curr. Biol.* *26*, R786–791.

Boukhatmi, H., and Bray, S. (2018). A population of adult satellite-like cells in *Drosophila* is maintained through a switch in RNA-isoforms. *Elife* *7*.

Boukhatmi, H., Frendo, J.L., Enriquez, J., Crozatier, M., Dubois, L., and Vincent, A. (2012). *Tup/Islet1* integrates time and position to specify muscle identity in *Drosophila*. *Development* *139*, 3572–3582.

Boukhatmi, H., Schaub, C., Bataillé, L., Reim, I., Frendo, J.-L., Frasch, M., and Vincent, A. (2014). An *Org-1-Tup* transcriptional cascade reveals different types of alary muscles connecting internal organs in *Drosophila*. *Development* *141*, 3761–3771.

Boulay, J.L., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1987). The *Drosophila* developmental gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* *330*, 395–398.

Bour, B.A., O'Brien, M.A., Lockwood, W.L., Goldstein, E.S., Bodmer, R., Taghert, P.H., Abmayr, S.M., and Nguyen, H.T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* *9*, 730–741.

Bour, B.A., Chakravarti, M., West, J.M., and Abmayr, S.M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev.* *14*, 1498–1511.

Bourgouin, C., Lundgren, S.E., and Thomas, J.B. (1992). *Apterous* is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* *9*, 549–561.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401–415.

Brennan, K., Klein, T., Wilder, E., and Arias, A.M. (1999). *Wingless* modulates the effects of dominant negative notch molecules in the developing wing of *Drosophila*. *Dev. Biol.* *216*, 210–229.

Broadie, K., and Bate, M. (1993). Muscle development is independent of innervation during *Drosophila* embryogenesis. *Development* *119*, 533–543.

Broadie, K.S., and Bate, M. (1991). The development of adult muscles in *Drosophila*: ablation of identified muscle precursor cells. *Development* *113*, 103–118.

Broihier, H.T., and Skeath, J.B. (2002). *Drosophila* homeodomain protein *dHb9* directs neuronal fate via crossrepressive and cell-nonautonomous mechanisms. *Neuron* *35*, 39–50.

Broihier, H.T., Kuzin, A., Zhu, Y., Odenwald, W., and Skeath, J.B. (2004). *Drosophila* homeodomain protein *Nkx6* coordinates motoneuron subtype identity and axonogenesis. *Development* *131*, 5233–5242.

Brown, N.H. (1994). Null mutations in the alpha PS2 and beta PS integrin subunit genes have distinct phenotypes. *Development* *120*, 1221–1231.

Buescher, M., Tio, M., Tear, G., Overton, P.M., Brook, W.J., and Chia, W. (2006). Functions of the segment polarity genes *midline* and *H15* in *Drosophila melanogaster* neurogenesis. *Dev. Biol.* *292*, 418–429.

Buff, E., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Jiménez, F., and Michelson, A.M. (1998). Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development* *125*, 2075–2086.

Bunch, T.A., Graner, M.W., Fessler, L.I., Fessler, J.H., Schneider, K.D., Kerschen, A., Choy, L.P.,

Burgess, B.W., and Brower, D.L. (1998). The PS2 integrin ligand tigrin is required for proper muscle function in *Drosophila*. *Development* *125*, 1679–1689.

Burchard, S., Paululat, A., Hinz, U., and Renkawitz-Pohl, R. (1995). The mutant not enough muscles (*nem*) reveals reduction of the *Drosophila* embryonic muscle pattern. *J. Cell. Sci.* *108* (Pt 4), 1443–1454.

Busser, B.W., Shokri, L., Jaeger, S.A., Gisselbrecht, S.S., Singhania, A., Berger, M.F., Zhou, B., Bulyk, M.L., and Michelson, A.M. (2012). Molecular mechanism underlying the regulatory specificity of a *Drosophila* homeodomain protein that specifies myoblast identity. *Development* *139*, 1164–1174.

Busser, B.W., Gisselbrecht, S.S., Shokri, L., Tansey, T.R., Gamble, C.E., Bulyk, M.L., and Michelson, A.M. (2013). Contribution of distinct homeodomain DNA binding specificities to *Drosophila* embryonic mesodermal cell-specific gene expression programs. *PLoS ONE* *8*, e69385.

Buttgereit, D., Leiss, D., Michiels, F., and Renkawitz-Pohl, R. (1991). During *Drosophila* embryogenesis the beta 1 tubulin gene is specifically expressed in the nervous system and the apodemes. *Mech. Dev.* *33*, 107–118.

Callahan, C.A., Bonkovsky, J.L., Scully, A.L., and Thomas, J.B. (1996). *derailed* is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*. *Development* *122*, 2761–2767.

Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1985). *The embryonic development of Drosophila melanogaster* (Berlin ; New York: Springer-Verlag).

Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1997b) . Peripheral nervous system. In *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. *2* , 177–220.

Capovilla, M., Kambris, Z., and Botas, J. (2001). Direct regulation of the muscle-identity gene *apterous* by a Hox protein in the somatic mesoderm. *Development* *128*, 1221–1230.

Carmena, A., Bate, M., and Jiménez, F. (1995). *Lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* *9*, 2373–2383.

Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jiménez, F., and Michelson, A.M. (1998a). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev.* *12*, 3910–3922.

Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jiménez, F., and Chia, W. (1998b). *Inscuteable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.* *12*, 304–315.

Carmena, A., Buff, E., Halfon, M.S., Gisselbrecht, S., Jiménez, F., Baylies, M.K., and Michelson, A.M. (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev. Biol.* *244*, 226–242.

Carrasco-Rando, M., and Ruiz-Gómez, M. (2008). *Mind bomb 2*, a founder myoblast-specific protein, regulates myoblast fusion and muscle stability. *Development* *135*, 849–857.

Carrasco-Rando, M., Tutor, A.S., Prieto-Sánchez, S., González-Pérez, E., Barrios, N., Letizia, A., Martín, P., Campuzano, S., and Ruiz-Gómez, M. (2011). *Drosophila* *araucan* and *caupolican* integrate intrinsic and signalling inputs for the acquisition by muscle progenitors of the lateral transverse fate. *PLoS Genet.* *7*, e1002186.

Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J., and Baylies, M.K. (2001). Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* *128*, 3145–3159.

de Celis, J.F., Tyler, D.M., de Celis, J., and Bray, S.J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* *125*, 4617–4626.

Certel, S.J., and Thor, S. (2004). Specification of *Drosophila* motoneuron identity by the combinatorial action of POU and LIM-HD factors. *Development* *131*, 5429–5439.

Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R., and Vorbrüggen, G. (2007). AlphaPS2 integrin-mediated muscle attachment in *Drosophila* requires the ECM protein Thrombospondin. *Mech. Dev.* *124*, 463–475.

Chaturvedi, D., Reichert, H., Gunage, R.D., and VijayRaghavan, K. (2017). Identification and functional characterization of muscle satellite cells in *Drosophila*. *Elife* *6*.

Chen, X., and Li, Y. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr* *3*, 337–341.

Chiba, A., Snow, P., Keshishian, H., and Hotta, Y. (1995). Fasciclin III as a synaptic target recognition molecule in *Drosophila*. *Nature* *374*, 166–168.

Chu-LaGraff, Q., and Doe, C.Q. (1993). Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the *Drosophila* CNS. *Science* *261*, 1594–1597.

Ciglar, L., Girardot, C., Wilczyński, B., Braun, M., and Furlong, E.E.M. (2014). Coordinated repression and activation of two transcriptional programs stabilizes cell fate during myogenesis. *Development* *141*, 2633–2643.

Clark, I.B.N., Boyd, J., Hamilton, G., Finnegan, D.J., and Jarman, A.P. (2006). D-six4 plays a key role in patterning cell identities deriving from the *Drosophila* mesoderm. *Dev. Biol.* *294*, 220–231.

de-la-Concha, A., Dietrich, U., Weigel, D., and Campos-Ortega, J.A. (1988). Functional interactions of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *118*, 499–508.

Cook, K.R., Parks, A.L., Jacobus, L.M., Kaufman, T.C., and Matthews, K.A. (2010). New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. *Fly (Austin)* *4*, 88–91.

Corbin, V., Michelson, A.M., Abmayr, S.M., Neel, V., Alcamo, E., Maniatis, T., and Young, M.W. (1991). A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell* *67*, 311–323.

Cripps, R.M., Black, B.L., Zhao, B., Lien, C.L., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1998). The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.* *12*, 422–434.

Cronmiller, C., and Cummings, C.A. (1993). The daughterless gene product in *Drosophila* is a nuclear protein that is broadly expressed throughout the organism during development. *Mech. Dev.* *42*, 159–169.

Crossley, A.C. (1978). The morphology and development of the *Drosophila* muscular system. *Ashburner, Wright, 1978-1980 b*: 499–560.

Crozatier, M., and Vincent, A. (1999). Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to notch signalling. *Development* *126*, 1495–1504.

Cunha, P.M.F., Sandmann, T., Gustafson, E.H., Ciglar, L., Eichenlaub, M.P., and Furlong, E.E.M. (2010). Combinatorial binding leads to diverse regulatory responses: Lmd is a tissue-specific modulator of Mef2 activity. *PLoS Genet.* *6*, e1001014.

Currie, D.A., and Bate, M. (1991). The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* *113*, 91–102.

Currie, D.A., and Bate, M. (1995). Innervation is essential for the development and differentiation of a sex-specific adult muscle in *Drosophila melanogaster*. *Development* *121*, 2549–2557.

Davis, G.W., Schuster, C.M., and Goodman, C.S. (1997). Genetic analysis of the mechanisms

controlling target selection: target-derived Fasciclin II regulates the pattern of synapse formation. *Neuron* 19, 561–573.

De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J.-P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J., and Jagla, K. (2004). The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells. *Dev. Biol.* 270, 122–134.

Demontis, F., and Perrimon, N. (2009). Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*. *Development* 136, 983–993.

Deng, H., Hughes, S.C., Bell, J.B., and Simmonds, A.J. (2009). Alternative requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 20, 256–269.

Desai, C.J., Gindhart, J.G., Goldstein, L.S., and Zinn, K. (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the *Drosophila* embryo. *Cell* 84, 599–609.

Dettman, R.W., Turner, F.R., and Raff, E.C. (1996). Genetic analysis of the *Drosophila* beta3-tubulin gene demonstrates that the microtubule cytoskeleton in the cells of the visceral mesoderm is required for morphogenesis of the midgut endoderm. *Dev. Biol.* 177, 117–135.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblaue, S., et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151–156.

Doberstein, S.K., Fetter, R.D., Mehta, A.Y., and Goodman, C.S. (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J. Cell Biol.* 136, 1249–1261.

Dobi, K.C., Halfon, M.S., and Baylies, M.K. (2014). Whole-genome analysis of muscle founder cells implicates the chromatin regulator Sin3A in muscle identity. *Cell Rep* 8, 858–870.

Dobi, K.C., Schulman, V.K., and Baylies, M.K. (2015). Specification of the somatic musculature in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 357–375.

Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855–863.

Doherty, D., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. The *Drosophila* neurogenic gene big brain, which encodes a membrane-associated protein, acts cell autonomously and can act synergistically with Notch and Delta. 13.

Dohrmann, C., Azpiazu, N., and Frasch, M. (1990). A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev.* 4, 2098–2111.

Drysdale, R., Rushton, E., and Bate, M. (1993). Genes required for embryonic muscle development in *Drosophila melanogaster* A survey of the X chromosome. *Roux Arch. Dev. Biol.* 202, 276–295.

Duan, H., Skeath, J.B., and Nguyen, H.T. (2001). *Drosophila* Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128, 4489–4500.

Duan, H., Zhang, C., Chen, J., Sink, H., Frei, E., and Noll, M. (2007). A key role of Pox meso in somatic myogenesis of *Drosophila*. *Development* 134, 3985–3997.

Duan, R., Kim, J.H., Shilagardi, K., Schiffhauer, E.S., Lee, D.M., Son, S., Li, S., Thomas, C., Luo, T., Fletcher, D.A., et al. (2018). Spectrin is a mechanoresponsive protein shaping fusogenic synapse architecture during myoblast fusion. *Nat. Cell Biol.* 20, 688–698.

Dubois, L., Enriquez, J., Daburon, V., Crozet, F., Lebreton, G., Crozatier, M., and Vincent, A.

(2007). Collier transcription in a single *Drosophila* muscle lineage: the combinatorial control of muscle identity. *Development* *134*, 4347–4355.

Dubois, L., Frendo, J.-L., Chanut-Delalande, H., Crozatier, M., and Vincent, A. (2016). Genetic dissection of the Transcription Factor code controlling serial specification of muscle identities in *Drosophila*. *Elife* *5*.

Dutta, D., Anant, S., Ruiz-Gomez, M., Bate, M., and VijayRaghavan, K. (2004). Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* *131*, 3761–3772.

Dutta, D., Shaw, S., Maqbool, T., Pandya, H., and Vijayraghavan, K. (2005). *Drosophila* Heartless acts with Heartbroken/Dof in muscle founder differentiation. *PLoS Biol.* *3*, e337.

Dworak, H.A., Charles, M.A., Pellerano, L.B., and Sink, H. (2001). Characterization of *Drosophila* hibris, a gene related to human nephrin. *Development* *128*, 4265–4276.

Elgar, S.J., Han, J., and Taylor, M.V. (2008). *mef2* activity levels differentially affect gene expression during *Drosophila* muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 918–923.

Elwell, J.A., Lovato, T.L., Adams, M.M., Baca, E.M., Lee, T., and Cripps, R.M. (2015). The myogenic repressor gene Holes in muscles is a direct transcriptional target of Twist and Tinman in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev. Biol.* *400*, 266–276.

Enriquez, J., Boukhatmi, H., Dubois, L., Philippakis, A.A., Bulyk, M.L., Michelson, A.M., Crozatier, M., and Vincent, A. (2010). Multi-step control of muscle diversity by Hox proteins in the *Drosophila* embryo. *Development* *137*, 457–466.

Enriquez, J., de Taffin, M., Crozatier, M., Vincent, A., and Dubois, L. (2012). Combinatorial coding of *Drosophila* muscle shape by Collier and Nautilus. *Dev. Biol.* *363*, 27–39.

Estrada, B., Gisselbrecht, S.S., and Michelson, A.M. (2007). The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the *Drosophila* embryo. *Development* *134*, 4469–4478.

Ewen-Campen, B., Yang-Zhou, D., Fernandes, V.R., González, D.P., Liu, L.-P., Tao, R., Ren, X., Sun, J., Hu, Y., Zirin, J., et al. (2017). Optimized strategy for in vivo Cas9-activation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 9409–9414.

Fambrough, D., and Goodman, C.S. (1996). The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* *87*, 1049–1058.

Farrell, E.R., and Keshishian, H. (1999). Laser ablation of persistent twist cells in *Drosophila*: muscle precursor fate is not segmentally restricted. *Development* *126*, 273–280.

Farrell, E.R., Fernandes, J., and Keshishian, H. (1996). Muscle organizers in *Drosophila*: the role of persistent larval fibers in adult flight muscle development. *Dev. Biol.* *176*, 220–229.

Fernandes, J., Bate, M., and Vijayraghavan, K. (1991). Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* *113*, 67–77.

Figeac, N., Daczewska, M., Marcelle, C., and Jagla, K. (2007). Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev. Dyn.* *236*, 3332–3342.

Figeac, N., Jagla, T., Aradhya, R., Da Ponte, J.P., and Jagla, K. (2010). *Drosophila* adult muscle precursors form a network of interconnected cells and are specified by the rhomboid-triggered EGF pathway. *Development* *137*, 1965–1973.

Fogerty, F.J., Fessler, L.I., Bunch, T.A., Yaron, Y., Parker, C.G., Nelson, R.E., Brower, D.L., Gullberg, D., and Fessler, J.H. (1994). Tiggrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* *120*, 1747–1758.

Frasch, M. (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464–467.

Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., and Levine, M. (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *EMBO J.* 6, 749–759.

Friedman, R., and Hughes, A.L. (2001). Pattern and timing of gene duplication in animal genomes. *Genome Res.* 11, 1842–1847.

Frommer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H., and Volk, T. (1996). Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *EMBO J.* 15, 1642–1649.

Fullilove, S. L., Jacobson, A. G. and Turner, F. R. (1978). Embryonic development: descriptive. In *Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 2c (ed. M. Ashburner and T. R. F. Wright), pp. 105-143. New York: Academic Press.

Galletta, B.J., Chakravarti, M., Banerjee, R., and Abmayr, S.M. (2004). SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mech. Dev.* 121, 1455–1468.

Gantz, V.M., and Bier, E. (2015). Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348, 442–444.

Gantz, V.M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V.M., Bier, E., and James, A.A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E6736-6743.

Garces, A., and Thor, S. (2006). Specification of *Drosophila* aCC motoneuron identity by a genetic cascade involving even-skipped, grain and zfh1. *Development* 133, 1445–1455.

Garces, A., Bogdanik, L., Thor, S., and Carroll, P. (2006). Expression of *Drosophila* BarH1-H2 homeoproteins in developing dopaminergic cells and segmental nerve a (SNa) motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* 24, 37–44.

Gaul, U., Seifert, E., Schuh, R., and Jäckle, H. (1987). Analysis of Krüppel protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation. *Cell* 50, 639–647.

Gildor, B., Massarwa, R., Shilo, B.-Z., and Schejter, E.D. (2009). The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. *EMBO Rep.* 10, 1043–1050.

Gisselbrecht, S., Skeath, J.B., Doe, C.Q., and Michelson, A.M. (1996). heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 10, 3003–3017.

Gong, W.J., McKim, K.S., and Hawley, R.S. (2005). All paired up with no place to go: pairing, synapsis, and DSB formation in a balancer heterozygote. *PLoS Genet.* 1, e67.

González-Crespo, S., and Levine, M. (1993). Interactions between dorsal and helix-loop-helix proteins initiate the differentiation of the embryonic mesoderm and neuroectoderm in *Drosophila*. *Genes Dev.* 7, 1703–1713.

Gorczyca, M., Augart, C., and Budnik, V. (1993). Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 13, 3692–3704.

Gorczyca, M.G., Phillis, R.W., and Budnik, V. (1994). The role of tinman, a mesodermal cell fate gene, in axon pathfinding during the development of the transverse nerve in *Drosophila*. *Development* 120, 2143–2152.

Gotwals, P.J., Fessler, L.I., Wehrli, M., and Hynes, R.O. (1994). *Drosophila* PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11447–11451.

Grau, Y., Carteret, C., and Simpson, P. (1984). Mutations and Chromosomal Rearrangements

Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* *108*, 347–360.

Greig, S., and Akam, M. (1993). Homeotic genes autonomously specify one aspect of pattern in the *Drosophila* mesoderm. *Nature* *362*, 630–632.

Grenningloh, G., Rehm, E.J., and Goodman, C.S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell* *67*, 45–57.

Grossniklaus, U., Pearson, R.K., and Gehring, W.J. (1992). The *Drosophila* sloppy paired locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors. *Genes Dev.* *6*, 1030–1051.

Grueber, W.B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* *129*, 2867–2878.

Gunage, R.D., Reichert, H., and VijayRaghavan, K. (2014). Identification of a new stem cell population that generates *Drosophila* flight muscles. *Elife* *3*.

Guo, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* *17*, 27–41.

Halfon, M.S., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Sackerson, C.M., Jiménez, F., Baylies, M.K., and Michelson, A.M. (2000). Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* *103*, 63–74.

Halter, D.A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S.S., Ito, K., Travers, A.A., and Technau, G.M. (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* *121*, 317–332.

Han, C., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2011). Enhancer-driven membrane markers for analysis of nonautonomous mechanisms reveal neuron-glia interactions in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9673–9678.

Harris, R., Sabatelli, L.M., and Seeger, M.A. (1996). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* *17*, 217–228.

Hatini, V., and DiNardo, S. (2001). Distinct signals generate repeating striped pattern in the embryonic parasegment. *Mol. Cell* *7*, 151–160.

Hertweck, H. (1931). Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Z. wiss. Zool.* *139*: 560–663.

Hessinger, C., Technau, G.M., and Rogulja-Ortmann, A. (2017). The *Drosophila* Hox gene *Ultrabithorax* acts in both muscles and motoneurons to orchestrate formation of specific neuromuscular connections. *Development* *144*, 139–150.

Hidalgo, A., and Booth, G.E. (2000). Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* *127*, 393–402.

von Hilchen, C.M., Beckervordersandforth, R.M., Rickert, C., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2008). Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* *125*, 337–352.

von Hilchen, C.M., Hein, I., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2010). Netrins guide migration of distinct glial cells in the *Drosophila* embryo. *Development* *137*, 1251–1262.

von Hilchen, C.M., Bustos, A.E., Giangrande, A., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2013). Predetermined embryonic glial cells form the distinct glial sheaths of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Development* *140*, 3657–3668.

Ho, R.K., Ball, E.E., and Goodman, C.S. (1983). Muscle pioneers: large mesodermal cells that erect a scaffold for developing muscles and motoneurons in grasshopper embryos. *Nature*

301, 66–69.

Hoang, B., and Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev. Biol.* *229*, 55–70.

Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K., and Hotta, Y. (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* *82*, 1025–1036.

Hu, Y., Vinayagam, A., Nand, A., Comjean, A., Chung, V., Hao, T., Mohr, S.E., and Perrimon, N. (2018). Molecular Interaction Search Tool (MIST): an integrated resource for mining gene and protein interaction data. *Nucleic Acids Res.* *46*, D567–D574.

Huang, H., and Kornberg, T.B. (2015). Myoblast cytonemes mediate Wg signaling from the wing imaginal disc and Delta-Notch signaling to the air sac primordium. *Elife* *4*, e06114.

Hurd, T.R., Liang, F.-X., and Lehmann, R. (2015). Curly Encodes Dual Oxidase, Which Acts with Heme Peroxidase Curly Su to Shape the Adult *Drosophila* Wing. *PLoS Genet.* *11*, e1005625.

Inaki, M., Shinza-Kameda, M., Ismat, A., Frasch, M., and Nose, A. (2010). *Drosophila* Tey represses transcription of the repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. *Development* *137*, 2139–2146.

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* *6*, 1518–1530.

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., and Doe, C.Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* *106*, 511–521.

Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M., and Jagla, K. (1998). ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* *125*, 3699–3708.

Jagla, T., Bidet, Y., Da Ponte, J.P., Dastugue, B., and Jagla, K. (2002). Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in *Drosophila*. *Development* *129*, 1037–1047.

Jenett, A., Rubin, G.M., Ngo, T.-T.B., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., et al. (2012). A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep* *2*, 991–1001.

Jia, Y., Xu, R.-G., Ren, X., Ewen-Campen, B., Rajakumar, R., Zirin, J., Yang-Zhou, D., Zhu, R., Wang, F., Mao, D., et al. (2018). Next-generation CRISPR/Cas9 transcriptional activation in *Drosophila* using flySAM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, 4719–4724.

Jiménez, F., and Campos-Ortega, J.A. (1982). Maternal effects of zygotic mutants affecting early neurogenesis in *Drosophila*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* *191*, 191–201.

Johansen, J., Halpern, M.E., and Keshishian, H. (1989). Axonal guidance and the development of muscle fiber-specific innervation in *Drosophila* embryos. *J. Neurosci.* *9*, 4318–4332.

Jones, B.W., Fetter, R.D., Tear, G., and Goodman, C.S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* *82*, 1013–1023.

de Jossineau, C., Bataillé, L., Jagla, T., and Jagla, K. (2012). Diversification of muscle types in *Drosophila*: upstream and downstream of identity genes. *Curr. Top. Dev. Biol.* *98*, 277–301.

Junion, G., Jagla, T., Duplant, S., Tapin, R., Da Ponte, J.-P., and Jagla, K. (2005). Mapping Dmef2-binding regulatory modules by using a ChIP-enriched in silico targets approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 18479–18484.

Junion, G., Bataillé, L., Jagla, T., Da Ponte, J.P., Tapin, R., and Jagla, K. (2007). Genome-wide view of cell fate specification: ladybird acts at multiple levels during diversification of muscle and heart precursors. *Genes Dev.* *21*, 3163–3180.

Kanai, M.I., Okabe, M., and Hiromi, Y. (2005). seven-up Controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Cell* 8, 203–213.

Kasai, Y., Nambu, J.R., Lieberman, P.M., and Crews, S.T. (1992). Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3414–3418.

Keder, A., Rives-Quinto, N., Aerne, B.L., Franco, M., Tapon, N., and Carmena, A. (2015). The hippo pathway core cassette regulates asymmetric cell division. *Curr. Biol.* 25, 2739–2750.

Keleman, K., and Dickson, B.J. (2001). Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32, 605–617.

Keller, C.A., Erickson, M.S., and Abmayr, S.M. (1997). Misexpression of nautilus induces myogenesis in cardioblasts and alters the pattern of somatic muscle fibers. *Dev. Biol.* 181, 197–212.

Keller, C.A., Grill, M.A., and Abmayr, S.M. (1998). A role for nautilus in the differentiation of muscle precursors. *Dev. Biol.* 202, 157–171.

Kelly, K.K., Meadows, S.M., and Cripps, R.M. (2002). *Drosophila* MEF2 is a direct regulator of Actin57B transcription in cardiac, skeletal, and visceral muscle lineages. *Mech. Dev.* 110, 39–50.

Kesper, D.A., Stute, C., Buttgereit, D., Kreisköther, N., Vishnu, S., Fischbach, K.-F., and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev. Dyn.* 236, 404–415.

Khare, N., Fascetti, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R., and Baumgartner, S. (2000). Expression patterns of two new members of the Semaphorin family in *Drosophila* suggest early functions during embryogenesis. *Mech. Dev.* 91, 393–397.

Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205–215.

Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785–794.

Kim, J.H., Ren, Y., Ng, W.P., Li, S., Son, S., Kee, Y.-S., Zhang, S., Zhang, G., Fletcher, D.A., Robinson, D.N., et al. (2015). Mechanical tension drives cell membrane fusion. *Dev. Cell* 32, 561–573.

Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S.N., Sens, K.L., Bo, J., Gonzalez, G.A., and Chen, E.H. (2007). A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev. Cell* 12, 571–586.

Kimble, M., Incardona, J.P., and Raff, E.C. (1989). A variant beta-tubulin isoform of *Drosophila melanogaster* (beta 3) is expressed primarily in tissues of mesodermal origin in embryos and pupae, and is utilized in populations of transient microtubules. *Dev. Biol.* 131, 415–429.

Klingseisen, A., Clark, I.B.N., Gryzik, T., and Müller, H.-A.J. (2009). Differential and overlapping functions of two closely related *Drosophila* FGF8-like growth factors in mesoderm development. *Development* 136, 2393–2402.

Knirr, S., and Frasch, M. (2001). Molecular integration of inductive and mesoderm-intrinsic inputs governs even-skipped enhancer activity in a subset of pericardial and dorsal muscle progenitors. *Dev. Biol.* 238, 13–26.

Knirr, S., Breuer, S., Paululat, A., and Renkawitz-Pohl, R. (1997). Somatic mesoderm differentiation and the development of a subset of pericardial cells depend on the not enough muscles (nem) locus, which contains the inscuteable gene and the intron located

gene, skittles. *Mech. Dev.* 67, 69–81.

Knirr, S., Azpiazu, N., and Frasch, M. (1999). The role of the NK-homeobox gene *slouch* (*S59*) in somatic muscle patterning. *Development* 126, 4525–4535.

Kohsaka, H., and Nose, A. (2009). Target recognition at the tips of postsynaptic filopodia: accumulation and function of *Capricious*. *Development* 136, 1127–1135.

Kohsaka, H., Okusawa, S., Itakura, Y., Fushiki, A., and Nose, A. (2012). Development of larval motor circuits in *Drosophila*. *Dev. Growth Differ.* 54, 408–419.

Kohwi, M., and Doe, C.Q. (2013). Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 823–838.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389–1399.

Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). *frazzled* encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87, 197–204.

Kondo, S., and Ueda, R. (2013). Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* 195, 715–721.

Kornberg, T., Sidén, I., O’Farrell, P., and Simon, M. (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* 40, 45–53.

Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M., and Arora, K. (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254, 118–122.

Kramer, S.G., Kidd, T., Simpson, J.H., and Goodman, C.S. (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* 292, 737–740.

Kraut, R., and Campos-Ortega, J.A. (1996). *inscuteable*, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev. Biol.* 174, 65–81.

Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A. (1996). Role of *inscuteable* in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50–55.

Krueger, N.X., Van Vactor, D., Wan, H.I., Gelbart, W.M., Goodman, C.S., and Saito, H. (1996). The transmembrane tyrosine phosphatase *DLAR* controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 84, 611–622.

Kumar, R.P., Dobi, K.C., Baylies, M.K., and Abmayr, S.M. (2015). Muscle cell fate choice requires the T-box transcription factor *midline* in *Drosophila*. *Genetics* 199, 777–791.

Kurusu, M., Cording, A., Taniguchi, M., Menon, K., Suzuki, E., and Zinn, K. (2008). A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection. *Neuron* 59, 972–985.

Labrador, J.P., O’keefe, D., Yoshikawa, S., McKinnon, R.D., Thomas, J.B., and Bashaw, G.J. (2005). The homeobox transcription factor *even-skipped* regulates netrin-receptor expression to control dorsal motor-axon projections in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1413–1419.

Lahaye, L.L., Wouda, R.R., de Jong, A.W.M., 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.

Lai, E.C., Bodner, R., and Posakony, J.W. (2000). The enhancer of split complex of *Drosophila* includes four Notch-regulated members of the bearded gene family. *Development* 127, 3441–3455.

Lai, Z.C., Fortini, M.E., and Rubin, G.M. (1991). The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mech.*

Dev. 34, 123–134.

Lai, Z.C., Rushton, E., Bate, M., and Rubin, G.M. (1993). Loss of function of the *Drosophila* *zfh-1* gene results in abnormal development of mesodermally derived tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 4122–4126.

Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G.M., and Bate, M. (1997). The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motorneurons of *Drosophila*. J. Neurosci. 17, 9642–9655.

Landgraf, M., Baylies, M., and Bate, M. (1999a). Muscle founder cells regulate defasciculation and targeting of motor axons in the *Drosophila* embryo. Curr. Biol. 9, 589–592.

Landgraf, M., Roy, S., Prokop, A., VijayRaghavan, K., and Bate, M. (1999b). *even-skipped* determines the dorsal growth of motor axons in *Drosophila*. Neuron 22, 43–52.

Landgraf, M., Sánchez-Soriano, N., Technau, G.M., Urban, J., and Prokop, A. (2003). Charting the *Drosophila* neuropile: a strategy for the standardised characterisation of genetically amenable neurites. Dev. Biol. 260, 207–225.

Lawrence, P.A. (1982). Cell lineage of the thoracic muscles of *Drosophila*. Cell 29, 493–503.

Lawrence, P.A., and Brower, D.L. (1982). Myoblasts from *Drosophila* wing disks can contribute to developing muscles throughout the fly. Nature 295, 55.

Layden, M.J., Odden, J.P., Schmid, A., Garces, A., Thor, S., and Doe, C.Q. (2006). *Zfh1*, a somatic motor neuron transcription factor, regulates axon exit from the CNS. Dev. Biol. 291, 253–263.

Lee, H.H., and Frasch, M. (2000). Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target *sloppy* paired. Development 127, 5497–5508.

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, P.-T., Zirin, J., Kanca, O., Lin, W.-W., Schulze, K.L., Li-Kroeger, D., Tao, R., Devereaux, C., Hu, Y., Chung, V., et al. (2018). A gene-specific T2A-GAL4 library for *Drosophila*. Elife 7.

Lehmann, R., Dietrich, U., Jiménez, F., and Campos-Ortega, J.A. (1981). Mutations of early neurogenesis in *Drosophila*. Wilhelm Roux Arch Dev Biol 190, 226–229.

Lehmann, R., Jiménez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J.A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology 192, 62–74.

Leiss, D., Hinz, U., Gasch, A., Mertz, R., and Renkawitz-Pohl, R. (1988). Beta 3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis. Development 104, 525–531.

Leptin, M. (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. Genes Dev. 5, 1568–1576.

Li, H., Watson, A., Olechwier, A., Anaya, M., Sorooshyari, S.K., Harnett, D.P., Lee, H.-K.P., Vielmetter, J., Fares, M.A., Garcia, K.C., et al. (2017). Deconstruction of the beaten Path-Sidestep interaction network provides insights into neuromuscular system development. Elife 6.

Lilly, B., Galewsky, S., Firulli, A.B., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1994). D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 5662–5666.

Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B.M., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in

Drosophila. *Science* 267, 688–693.

Lin, D.M., and Goodman, C.S. (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13, 507–523.

Lin, D.M., Auld, V.J., and Goodman, C.S. (1995). Targeted neuronal cell ablation in the *Drosophila* embryo: pathfinding by follower growth cones in the absence of pioneers. *Neuron* 14, 707–715.

Lin, M.H., Bour, B.A., Abmayr, S.M., and Storti, R.V. (1997a). Ectopic expression of MEF2 in the epidermis induces epidermal expression of muscle genes and abnormal muscle development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 182, 240–255.

Lin, S.C., Lin, M.H., Horváth, P., Reddy, K.L., and Storti, R.V. (1997b). PDP1, a novel *Drosophila* PAR domain bZIP transcription factor expressed in developing mesoderm, endoderm and ectoderm, is a transcriptional regulator of somatic muscle genes. *Development* 124, 4685–4696.

Liotta, D., Han, J., Elgar, S., Garvey, C., Han, Z., and Taylor, M.V. (2007). The Him gene reveals a balance of inputs controlling muscle differentiation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17, 1409–1413.

Luan, H., Peabody, N.C., Vinson, C.R., and White, B.H. (2006). Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron* 52, 425–436.

Lyne, R., Smith, R., Rutherford, K., Wakeling, M., Varley, A., Guillier, F., Janssens, H., Ji, W., McLaren, P., North, P., et al. (2007). FlyMine: an integrated database for *Drosophila* and *Anopheles* genomics. *Genome Biol.* 8, R129.

MacKay, J.O., Soanes, K.H., Srivastava, A., Simmonds, A., Brook, W.J., and Bell, J.B. (2003). An in vivo analysis of the vestigial gene in *Drosophila melanogaster* defines the domains required for Vg function. *Genetics* 163, 1365–1373.

Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E.L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R., and Baumgartner, S. (1999). wing blister, a new *Drosophila* laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J. Cell Biol.* 145, 191–201.

Martinez-Arias, A., and Lawrence, P.A. (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* 313, 639–642.

Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B.-Z., and Schejter, E.D. (2007). WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Cell* 12, 557–569.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493–495.

Meadows, L.A., Gell, D., Broadie, K., Gould, A.P., and White, R.A. (1994). The cell adhesion molecule, connectin, and the development of the *Drosophila* neuromuscular system. *J. Cell. Sci.* 107 (Pt 1), 321–328.

Merritt, D.J., and Whittington, P.M. (1995). Central projections of sensory neurons in the *Drosophila* embryo correlate with sensory modality, soma position, and proneural gene function. *J. Neurosci.* 15, 1755–1767.

Meyer, F., and Aberle, H. (2006). At the next stop sign turn right: the metalloprotease Tolloid-related 1 controls defasciculation of motor axons in *Drosophila*. *Development* 133, 4035–4044.

Michelson, A.M. (1994). Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development* 120, 755–768.

Michelson, A.M., Abmayr, S.M., Bate, M., Arias, A.M., and Maniatis, T. (1990). Expression of

a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* *4*, 2086–2097.

Michelson, A.M., Gisselbrecht, S., Buff, E., and Skeath, J.B. (1998). Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* *125*, 4379–4389.

Miller, C.M., Page-McCaw, A., and Broihier, H.T. (2008). Matrix metalloproteinases promote motor axon fasciculation in the *Drosophila* embryo. *Development* *135*, 95–109.

Miller, D.E., Cook, K.R., Yeganeh Kazemi, N., Smith, C.B., Cockrell, A.J., Hawley, R.S., and Bergman, C.M. (2016). Rare recombination events generate sequence diversity among balancer chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *113*, E1352–1361.

Miller, D.F., Rogers, B.T., Kalkbrenner, A., Hamilton, B., Holtzman, S.L., and Kaufman, T. (2001). Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mech. Dev.* *102*, 3–16.

Mitchell, K.J., Doyle, J.L., Serafini, T., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Dickson, B.J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* *17*, 203–215.

Monastirioti, M., Gorczyca, M., Rapus, J., Eckert, M., White, K., and Budnik, V. (1995). Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* *356*, 275–287.

Müller, D., Jagla, T., Bodart, L.M., Jährling, N., Dodt, H.-U., Jagla, K., and Frasch, M. (2010). Regulation and functions of the *lms* homeobox gene during development of embryonic lateral transverse muscles and direct flight muscles in *Drosophila*. *PLoS ONE* *5*, e14323.

Myers, E.W., Sutton, G.G., Delcher, A.L., Dew, I.M., Fasulo, D.P., Flanigan, M.J., Kravitz, S.A., Mobarry, C.M., Reinert, K.H., Remington, K.A., et al. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* *287*, 2196–2204.

Nguyen, H.T., and Xu, X. (1998). *Drosophila* *mef2* expression during mesoderm development is controlled by a complex array of cis-acting regulatory modules. *Dev. Biol.* *204*, 550–566.

Nguyen, H.T., Bodmer, R., Abmayr, S.M., McDermott, J.C., and Spoerel, N.A. (1994). *D-mef2*: a *Drosophila* mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 7520–7524.

Nose, A., Mahajan, V.B., and Goodman, C.S. (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* *70*, 553–567.

Nose, A., Umeda, T., and Takeichi, M. (1997). Neuromuscular target recognition by a homophilic interaction of connectin cell adhesion molecules in *Drosophila*. *Development* *124*, 1433–1441.

Nose, A., Isshiki, T., and Takeichi, M. (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development* *125*, 215–223.

Nowak, S.J., Aihara, H., Gonzalez, K., Nibu, Y., and Baylies, M.K. (2012). Akirin links twist-regulated transcription with the Brahma chromatin remodeling complex during embryogenesis. *PLoS Genet.* *8*, e1002547.

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* *193*, 267–282.

Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev. Biol.* *203*, 435–450.

Ohayon, D., Pattyn, A., Venteo, S., Valmier, J., Carroll, P., and Garces, A. (2009). Zfh1 promotes survival of a peripheral glia subtype by antagonizing a Jun N-terminal kinase-dependent apoptotic pathway. *EMBO J.* *28*, 3228–3243.

Orgogozo, V., and Grueber, W.B. (2005). FlyPNS, a database of the *Drosophila* embryonic and larval peripheral nervous system. *BMC Dev. Biol.* *5*, 4.

Oyallon, J., Apitz, H., Miguel-Aliaga, I., Timofeev, K., Ferreira, L., and Salecker, I. (2012). Regulation of locomotion and motoneuron trajectory selection and targeting by the *Drosophila* homolog of Olig family transcription factors. *Dev. Biol.* *369*, 261–276.

Ozdemir, A., Fisher-Aylor, K.I., Pepke, S., Samanta, M., Dunipace, L., McCue, K., Zeng, L., Ogawa, N., Wold, B.J., and Stathopoulos, A. (2011). High resolution mapping of Twist to DNA in *Drosophila* embryos: Efficient functional analysis and evolutionary conservation. *Genome Res.* *21*, 566–577.

Özkan, E., Carrillo, R.A., Eastman, C.L., Weiszmann, R., Waghray, D., Johnson, K.G., Zinn, K., Celniker, S.E., and Garcia, K.C. (2013). An extracellular interactome of immunoglobulin and LRR proteins reveals receptor-ligand networks. *Cell* *154*, 228–239.

Parker, L., Ellis, J.E., Nguyen, M.Q., and Arora, K. (2006). The divergent TGF-beta ligand Dawdle utilizes an activin pathway to influence axon guidance in *Drosophila*. *Development* *133*, 4981–4991.

Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Wrana, J.L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J.A., Massagué, J., and Hoffmann, F.M. (1994). Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell* *78*, 239–250.

Pérez-Moreno, J.J., Espina-Zambrano, A.G., García-Calderón, C.B., and Estrada, B. (2017). Kon-tiki enhances PS2 integrin adhesion and localizes its ligand, Thrombospondin, in the myotendinous junction. *J. Cell. Sci.* *130*, 950–962.

Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.-T.B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Laverly, T.R., et al. (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 9715–9720.

Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (2000). *Drosophila* segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol. Cell* *6*, 203–209.

Pipes, G.C., Lin, Q., Riley, S.E., and Goodman, C.S. (2001). The Beat generation: a multigene family encoding IgSF proteins related to the Beat axon guidance molecule in *Drosophila*. *Development* *128*, 4545–4552.

Poodry, C.A., and Schneiderman, H.A. (1970). The ultrastructure of the developing leg of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* *166*, 1–44.

Port, F., and Bullock, S.L. (2016). Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nat. Methods* *13*, 852–854.

Postigo, A.A., Ward, E., Skeath, J.B., and Dean, D.C. (1999). zfh-1, the *Drosophila* homologue of ZEB, is a transcriptional repressor that regulates somatic myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7255–7263.

Poulson, D.F. (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *23*, 133–137.

Poulson, D.F. (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* Meigen. *Demerec, 1950* : 168–274.

Prokop, A., Martín-Bermudo, M.D., Bate, M., and Brown, N.H. (1998). Absence of PS integrins or laminin A affects extracellular adhesion, but not intracellular assembly, of hemiadherens and neuromuscular junctions in *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* *196*, 58–76.

Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkenin, J.D., Olson, E.N., and Schulz, R.A. (1995). A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *171*, 169–181.

Rao, Y., Bodmer, R., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1992). The big brain gene of *Drosophila* functions to control the number of neuronal precursors in the peripheral nervous system. *Development* *116*, 31–40.

Ray, R.P., Arora, K., Nüsslein-Volhard, C., and Gelbart, W.M. (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* *113*, 35–54.

Rebeiz, M., Reeves, N.L., and Posakony, J.W. (2002). SCORE: a computational approach to the identification of cis-regulatory modules and target genes in whole-genome sequence data. Site clustering over random expectation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 9888–9893.

Reed, C.T., Murphy, C., and Fristrom, D. (1975). The ultrastructure of the differentiating pupal leg of *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* *178*, 285–302.

Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* *11*, 1114–1125.

Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* *76*, 477–491.

Richardson, B., Beckett, K., and Baylies, M. (2008). Visualizing new dimensions in *Drosophila* myoblast fusion. *Bioessays* *30*, 423–431.

Richardson, B.E., Beckett, K., Nowak, S.J., and Baylies, M.K. (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* *134*, 4357–4367.

Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R., and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* *124*, 2915–2922.

Ritzenthaler, S., Suzuki, E., and Chiba, A. (2000). Postsynaptic filopodia in muscle cells interact with innervating motoneuron axons. *Nat. Neurosci.* *3*, 1012–1017.

Roth, S., Stein, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* *59*, 1189–1202.

Roy, S., and VijayRaghavan, K. (1999). Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis. *Bioessays* *21*, 486–498.

Roy, S., Huang, H., Liu, S., and Kornberg, T.B. (2014). Cytoneme-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* decapentaplegic signaling protein. *Science* *343*, 1244624.

Ruiz Gómez, M., and Bate, M. (1997). Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* *124*, 4857–4866.

Ruiz-Gómez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jäckle, H., and Bate, M. (1997). Specific muscle identities are regulated by Krüppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development* *124*, 3407–3414.

Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V., and Bate, M. (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* *102*, 189–198.

Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Suster, M.L., Landgraf, M., and Bate, M. (2002). myoblasts incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development* *129*, 133–141.

Rushlow, C.A., Han, K., Manley, J.L., and Levine, M. (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* *59*, 1165–

1177.

Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M., and Bate, M. (1995). Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* *121*, 1979–1988.

Rutledge, B.J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y.N., and Perrimon, N. (1992). The *Drosophila* *spitz* gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev.* *6*, 1503–1517.

Sandmann, T., Jensen, L.J., Jakobsen, J.S., Karzynski, M.M., Eichenlaub, M.P., Bork, P., and Furlong, E.E.M. (2006). A temporal map of transcription factor activity: *mef2* directly regulates target genes at all stages of muscle development. *Dev. Cell* *10*, 797–807.

Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V., and Furlong, E.E.M. (2007). A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* *21*, 436–449.

Santiago, C., and Bashaw, G.J. (2014). Transcription factors and effectors that regulate neuronal morphology. *Development* *141*, 4667–4680.

Santiago, C., and Bashaw, G.J. (2017). *Islet* Coordinately Regulates Motor Axon Guidance and Dendrite Targeting through the *Frazzled/DCC* Receptor. *Cell Rep* *18*, 1646–1659.

Santiago, C., Labrador, J.-P., and Bashaw, G.J. (2014). The homeodomain transcription factor *Hb9* controls axon guidance in *Drosophila* through the regulation of *Robo* receptors. *Cell Rep* *7*, 153–165.

dos Santos, G., Schroeder, A.J., Goodman, J.L., Strelets, V.B., Crosby, M.A., Thurmond, J., Emmert, D.B., Gelbart, W.M., and FlyBase Consortium (2015). FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations. *Nucleic Acids Res.* *43*, D690–697.

Sarkissian, T., Arya, R., Gyonjyan, S., Taylor, B., and White, K. (2016). Cell death regulates muscle fiber number. *Dev. Biol.* *415*, 87–97.

Schäfer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Müller, A., Renkawitz-Pohl, R., and Onel, S.-F. (2007). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (*WASP*) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *304*, 664–674.

Schaub, C., Nagaso, H., Jin, H., and Frasch, M. (2012). *Org-1*, the *Drosophila* ortholog of *Tbx1*, is a direct activator of known identity genes during muscle specification. *Development* *139*, 1001–1012.

Schindelholz, B., Knirr, M., Warrior, R., and Zinn, K. (2001). Regulation of CNS and motor axon guidance in *Drosophila* by the receptor tyrosine phosphatase *DPTP52F*. *Development* *128*, 4371–4382.

Schmid, A., Chiba, A., and Doe, C.Q. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* *126*, 4653–4689.

Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., and Technau, G.M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* *189*, 186–204.

Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T., and Simcox, A. (1996). *Vein* is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev.* *10*, 2302–2313.

Schnorrer, F., and Dickson, B.J. (2004). Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev. Cell* *7*, 9–20.

Schnorrer, F., Kalchauer, I., and Dickson, B.J. (2007). The transmembrane protein *Kon-tiki*

couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev. Cell* *12*, 751–766.

Schröter, R.H., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klämbt, C., Beck, L., and Renkawitz-Pohl, R. (2004). *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* *131*, 4501–4509.

Schweitzer, R., Zelzer, E., and Volk, T. (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* *137*, 2807–2817.

Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C.S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* *10*, 409–426.

Sellin, J., Drechsler, M., Nguyen, H.T., and Paululat, A. (2009). Antagonistic function of *Lmd* and *Zfh1* fine tunes cell fate decisions in the *Tw* and *Tin* positive mesoderm of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* *326*, 444–455.

Sens, K.L., Zhang, S., Jin, P., Duan, R., Zhang, G., Luo, F., Parachini, L., and Chen, E.H. (2010). An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J. Cell Biol.* *191*, 1013–1027.

Sepp, K.J., and Auld, V.J. (2003). Reciprocal interactions between neurons and glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *J. Neurosci.* *23*, 8221–8230.

Sepp, K.J., Schulte, J., and Auld, V.J. (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev. Biol.* *238*, 47–63.

Shelton, C., Kocherlakota, K.S., Zhuang, S., and Abmayr, S.M. (2009). The immunoglobulin superfamily member *Hbs* functions redundantly with *Sns* in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* *136*, 1159–1168.

Shilagardi, K., Li, S., Luo, F., Marikar, F., Duan, R., Jin, P., Kim, J.H., Murnen, K., and Chen, E.H. (2013). Actin-propelled invasive membrane protrusions promote fusogenic protein engagement during cell-cell fusion. *Science* *340*, 359–363.

Shishido, E., Ono, N., Kojima, T., and Saigo, K. (1997). Requirements of *DFR1/Heartless*, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* *124*, 2119–2128.

Shishido, E., Takeichi, M., and Nose, A. (1998). *Drosophila* synapse formation: regulation by transmembrane protein with Leu-rich repeats, *CAPRICIOUS*. *Science* *280*, 2118–2121.

Siebert, M., Banovic, D., Goellner, B., and Aberle, H. (2009). *Drosophila* motor axons recognize and follow a *Sidestep*-labeled substrate pathway to reach their target fields. *Genes Dev.* *23*, 1052–1062.

Silies, M., and Klämbt, C. (2010). *APC/C(Fzr/Cdh1)*-dependent regulation of cell adhesion controls glial migration in the *Drosophila* PNS. *Nat. Neurosci.* *13*, 1357–1364.

Simpson, P. (1983). Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* *105*, 615–632.

Sink, H., Rehm, E.J., Richstone, L., Bulls, Y.M., and Goodman, C.S. (2001). *sidestep* encodes a target-derived attractant essential for motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* *105*, 57–67.

Skeath, J.B. (1998). The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* *125*, 3301–3312.

Skeath, J.B., and Carroll, S.B. (1994). The *achaete-scute* complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J.* *8*, 714–721.

Skeath, J.B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S.B., and Doe, C.Q. (1995). Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by *gooseberry*-

distal. *Nature* 376, 427–430.

Soler, C., and Taylor, M.V. (2009). The Him gene inhibits the development of *Drosophila* flight muscles during metamorphosis. *Mech. Dev.* 126, 595–603.

Soler, C., Laddada, L., and Jagla, K. (2016). Coordinated Development of Muscles and Tendon-Like Structures: Early Interactions in the *Drosophila* Leg. *Front Physiol* 7, 22.

Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17, 21–26.

Sparrow, J.C., and Schöck, F. (2009). The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 293–298.

Speicher, S., Fischer, A., Knoblich, J., and Carmena, A. (2008). The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors. *Curr. Biol.* 18, 831–837.

Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F.M., Baylies, M.K., Rushton, E., and Bate, M. (1994). dpp induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* 372, 783–786.

Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., and Levine, M. (2004). pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 18, 687–699.

Steward, R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* 59, 1179–1188.

Strükelberg, M., Bonengel, B., Moda, L.M., Hertenstein, A., de Couet, H.G., Ramos, R.G., and Fischbach, K.F. (2001). rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128, 4229–4239.

Subramanian, A., Wayburn, B., Bunch, T., and Volk, T. (2007). Thrombospondin-mediated adhesion is essential for the formation of the myotendinous junction in *Drosophila*. *Development* 134, 1269–1278.

Sudarsan, V., Anant, S., Guptan, P., VijayRaghavan, K., and Skaer, H. (2001). Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell* 1, 829–839.

Sweeney, N.T., Li, W., and Gao, F.-B. (2002). Genetic manipulation of single neurons in vivo reveals specific roles of flamingo in neuronal morphogenesis. *Dev. Biol.* 247, 76–88.

Takizawa, K., and Hotta, Y. (2001). Pathfinding analysis in a glia-less gcm mutant in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* 211, 30–36.

Tanaka, K.K.K., Bryantsev, A.L., and Cripps, R.M. (2008). Myocyte enhancer factor 2 and chorion factor 2 collaborate in activation of the myogenic program in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.* 28, 1616–1629.

Tapanes-Castillo, A., and Baylies, M.K. (2004). Notch signaling patterns *Drosophila* mesodermal segments by regulating the bHLH transcription factor twist. *Development* 131, 2359–2372.

Tatsumi, K., Tsuji, S., Miwa, H., Morisaku, T., Nuriya, M., Orihara, M., Kaneko, K., Okano, H., and Yasui, M. (2009). *Drosophila* big brain does not act as a water channel, but mediates cell adhesion. *FEBS Lett.* 583, 2077–2082.

Taylor, M.V. (2006). Comparison of Muscle Development in *Drosophila* and Vertebrates. In *Muscle Development in Drosophila*, (New York, NY: Springer New York), pp. 169–203.

Taylor, A.M., Nakano, Y., Mohler, J., and Ingham, P.W. (1993). Contrasting distributions of patched and hedgehog proteins in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 42, 89–96.

Taylor, M.V., Beatty, K.E., Hunter, H.K., and Baylies, M.K. (1995). *Drosophila* MEF2 is regulated by twist and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature. *Mech. Dev.* 50, 29–41.

Thisse, B., el Messal, M., and Perrin-Schmitt, F. (1987). The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* *15*, 3439–3453.

Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C., and Thisse, B. (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product. *Cell* *65*, 1191–1201.

Thomas, J.B., Bastiani, M.J., Bate, M., and Goodman, C.S. (1984). From grasshopper to *Drosophila*: a common plan for neuronal development. *Nature* *310*, 203–207.

Thor, S., and Thomas, J.B. (1997). The *Drosophila* islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron* *18*, 397–409.

Thor, S., Andersson, S.G., Tomlinson, A., and Thomas, J.B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* *397*, 76–80.

Tixier, V., Bataillé, L., Etard, C., Jagla, T., Weger, M., Daponte, J.P., Strähle, U., Dickmeis, T., and Jagla, K. (2013). Glycolysis supports embryonic muscle growth by promoting myoblast fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 18982–18987.

Tran, K.D., and Doe, C.Q. (2008). Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development* *135*, 3491–3499.

Tremml, G., and Bienz, M. (1989). Homeotic gene expression in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *EMBO J.* *8*, 2677–2685.

Turner, F.R., and Mahowald, A.P. (1977). Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis. II. Gastrulation and segmentation. *Dev. Biol.* *57*, 403–416.

Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1989). numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* *58*, 349–360.

Ursprung, H., Conscience-Egli, M., Fox, D.J., and Wallimann, T. (1972). Origin of leg musculature during *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *69*, 2812–2813.

Vactor, D.V., Sink, H., Fambrough, D., Tsou, R., and Goodman, C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* *73*, 1137–1153.

Vincent, S., Vonesch, J.L., and Giangrande, A. (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* *122*, 131–139.

Volk, T., and VijayRaghavan, K. (1994). A central role for epidermal segment border cells in the induction of muscle patterning in the *Drosophila* embryo. *Development* *120*, 59–70.

Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (1997). Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 8606–8611.

Vorbrüggen, G., Constien, R., Zilian, O., Wimmer, E.A., Dowe, G., Taubert, H., Noll, M., and Jäckle, H. (1997). Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in *Drosophila*. *Mech. Dev.* *68*, 139–147.

Ward, L. (1923). The Genetics of Curly Wing in *Drosophila*. Another Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics* *8*, 276–300.

Wayburn, B., and Volk, T. (2009). LRT, a tendon-specific leucine-rich repeat protein, promotes muscle-tendon targeting through its interaction with Robo. *Development* *136*, 3607–3615.

Wei, Q., Rong, Y., and Paterson, B.M. (2007). Stereotypic founder cell patterning and embryonic muscle formation in *Drosophila* require nautilus (MyoD) gene function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 5461–5466.

Williams, J.A., Atkin, A.L., and Bell, J.B. (1990). The functional organization of the vestigial locus in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* *221*, 8–16.

Wills, Z., Marr, L., Zinn, K., Goodman, C.S., and Van Vactor, D. (1999). Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* *22*, 291–299.

Winberg, M.L., Mitchell, K.J., and Goodman, C.S. (1998). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* *93*, 581–591.

Wong, M.-C., Castanon, I., and Baylies, M.K. (2008). Daughterless dictates Twist activity in a context-dependent manner during somatic myogenesis. *Dev. Biol.* *317*, 417–429.

Yarnitzky, T., Min, L., and Volk, T. (1997). The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev.* *11*, 2691–2700.

Yu, H.H., Araj, H.H., Ralls, S.A., and Kolodkin, A.L. (1998). The transmembrane Semaphorin Sema I is required in *Drosophila* for embryonic motor and CNS axon guidance. *Neuron* *20*, 207–220.

Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., and Sémériva, M. (1997). The held out wings (how) *Drosophila* gene encodes a putative RNA-binding protein involved in the control of muscular and cardiac activity. *Development* *124*, 2087–2098.

Zarin, A.A., Daly, A.C., Hülsmeier, J., Asadzadeh, J., and Labrador, J.-P. (2012). A GATA/homeodomain transcriptional code regulates axon guidance through the Unc-5 receptor. *Development* *139*, 1798–1805.

Zarin, A.A., Asadzadeh, J., Hokamp, K., McCartney, D., Yang, L., Bashaw, G.J., and Labrador, J.-P. (2014). A transcription factor network coordinates attraction, repulsion, and adhesion combinatorially to control motor axon pathway selection. *Neuron* *81*, 1297–1311.

Zeitlinger, J., Zinzen, R.P., Stark, A., Kellis, M., Zhang, H., Young, R.A., and Levine, M. (2007). Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* *21*, 385–390.

Zirin, J., Cheng, D., Dhanyasi, N., Cho, J., Dura, J.-M., Vijayraghavan, K., and Perrimon, N. (2013). Ecdysone signaling at metamorphosis triggers apoptosis of *Drosophila* abdominal muscles. *Dev. Biol.* *383*, 275–284.