



HAL
open science

MECANISMES DE REGULATION DE L'HEMATOPOÏESE EMBRYONNAIRE CHEZ LA DROSOPHILE

Laetitia Bataillé

► **To cite this version:**

Laetitia Bataillé. MECANISMES DE REGULATION DE L'HEMATOPOÏESE EMBRYONNAIRE CHEZ LA DROSOPHILE. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT: . tel-00110898

HAL Id: tel-00110898

<https://theses.hal.science/tel-00110898>

Submitted on 2 Nov 2006

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.

Année 2006

THESE DE DOCTORAT

UNIVERSITE PAUL SABATIER – TOULOUSE III

Spécialité : Biologie Moléculaire, Cellulaire et du Développement
Ecole Doctorale : Biologie- Santé- Biotechnologie

Présentée par

Laetitia BATAILLÉ

**MECANISMES DE REGULATION
DE L'HEMATOPOÏESE EMBRYONNAIRE
CHEZ LA DROSOPHILE**

Soutenue le 30 Juin 2006 devant la commission d'examen :

M Julian SMITH (CBD, Toulouse)

Mme Angela GIANGRANDE (IGBMC, Strasbourg)

M Michel GHO (Université Paris VI-CNRS, Paris)

Mme Marie MEISTER (Musée de Zoologie, Strasbourg)

M Lucas WALTZER (CBD, Toulouse)

M Marc HAENLIN (CBD, Toulouse)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse

Directeur de Thèse

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547 CNRS/UPS

Université Paul Sabatier – Toulouse III

118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09

REMERCIEMENTS

Je remercie Alain VINCENT de m'avoir accueilli au sein du Centre de Biologie du Développement. J'ai trouvé dans ce laboratoire d'excellentes conditions de travail et d'apprentissage. Je tiens aussi à te remercier pour ton soutien pendant toutes ces années.

Je remercie aussi chaleureusement Angela GIANGRANDE, Marie MEISTER et Michel GHO qui ont accepté de lire et de juger ce travail. Un grand merci à Julian SMITH qui a accepté de présider ce jury, et qui y est pour beaucoup si j'ai un engouement particulier pour la biologie du développement.

Je remercie Marc HAENLIN, fantastique et fantaisiste directeur de thèse, pour m'avoir permis de développer un projet qui m'a passionné pendant ces années et pour m'avoir apporté son savoir et son soutien au cours de cette aventure. J'ai beaucoup appris, scientifiquement et humainement à tes côtés. Je retiendrais aussi bien les envolées scientifiques, que certains emportements philosophiques, enfin bref, toutes les grandes discussions sur le sens de la vie... Encore merci pour ton enthousiasme et ton humanité.

Merci beaucoup à Lucas WALTZER, chef impressionnant mais finalement tellement sympathique. Je te dois énormément de choses et j'apprécie énormément de te connaître. C'est court mais je sais qu'on partage le même sens des remerciements.

Un grand merci à toutes les personnes de l'équipe, ceux d'aujourd'hui et ceux d'hier, Benoît pour ton soutien technique inestimable, Karène pour ta fraîcheur et ton enthousiasme pour les « questions fondamentales en biologie du développement ! », Sandrine, Géraldine, Vanessa, Dani, Romain et Fernando pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

Merci Corinne et David pour m'avoir montré ce que une mouche peut faire de nous, Muriel, Nicolas, Philippe, Daniel pour ta bonne humeur légendaire, Eric pour la vie qui t'anime, Bruno et Brice rois de l'informatique et de la microscopie, Mylène et Elisabeth, disponibles et efficaces, tout le service commun et particulièrement les préparateurs de milieu à mouche et tous les autres. Je pense aussi à tant d'autre personne qui m'ont permis de me sentir bien dans cette aventure qu'en bref, merci à tous les gens de cette étrange barque qu'est le CBD.

Merci Gaëlle. Il y a des rencontres qu'on n'oublie pas.

Merci Benoît, pour ton soutien et pour tellement d'autres choses. Tu es dans mon cœur.

- SOMMAIRE -

SOMMAIRE

- INTRODUCTION -	1
I. □ Les cellules sanguines : description et fonctions	1
A. Description des cellules sanguines chez la Drosophile	2
1. Les plasmacytes	2
2. Les cellules à cristaux	3
3. Les lamellocytes	3
B. Fonctions des hémocytes	4
1. Rôle des hémocytes lors du développement de l'organisme	4
1.1 Phagocytose des corps apoptotiques	4
1.2 Synthèse de matrice extra cellulaire	6
2. La réponse immunitaire chez la Drosophile	7
2.1 La réponse cellulaire	8
2.2 La réponse humorale	13
2.3 Relations entre la réponse cellulaire et la réponse humorale	14
II. L'hématopoïèse chez la Drosophile	15
A. Les processus hématopoïétiques	16
1. L'hématopoïèse embryonnaire	17
2. L'hématopoïèse larvaire	19
2.1 Origine de la glande lymphatique	19
2.2 L'hématopoïèse dans la glande lymphatique	20
3. Double origine des hémocytes au stade larvaire	22
B. La régulation génique de l'hématopoïèse	23
1. Régulation de l'hématopoïèse embryonnaire	23
1.1 Le facteur de transcription de type GATA, Serpent	23
1.2 Les facteurs de transcription Glial Cell Missing (Gcm) et Gcm2	25
1.3 Le facteur de transcription de type Runx, Lozange	26
1.4 Le cofacteur transcriptionnel de type FOG, U-Shaped	27
2. Régulation de l'hématopoïèse larvaire	28
2.1 Les facteurs Srp et Ush au cours de l'hématopoïèse larvaire	29
2.2 Rôles du facteur Gcm et du récepteur PVR dans la formation des plasmacytes	30
2.3 Rôle de Lz au cours de l'hématopoïèse larvaire	30
2.4 Le facteur de transcription Collier	31
2.5 La voie de signalisation Notch	31
2.6 Les voies de signalisation Ras, JAK/STAT et Toll et la formation des lamellocytes	33
III. Objectifs de ce travail	35
- RESULTATS -	36
<u>CHAPITRE I : Analyse de la fonction et du mode d'action de Serpent au cours de l'hématopoïèse embryonnaire</u>	36

I. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des deux isoformes codées par le gène serpent : SrpC et SrpNC	36
A. Introduction	36
B. Résultats : résumé	37
C. Résultats : publication	38
<i>Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in Drosophila haematopoiesis.</i>	
D. Discussion	39
1. Fonctions de SrpC et SrpNC au cours de l'hématopoïèse embryonnaire	39
2. Rôle du complexe SrpNC/Ush dans la régulation de l'hématopoïèse	41
3. Régulation de l'expression des gènes cibles par SrpC et SrpNC	43
4. Fonctions de SrpC et SrpNC dans d'autres processus développementaux	44
II. Mise en évidence du complexe Srp/Lz	46
A. Introduction	46
B. Résultats : résumé	47
C. Résultats : publication	47
<i>Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during Drosophila hematopoiesis.</i>	
D. Discussion	48
1. Régulation de l'expression des gènes cibles par le complexe Srp/Lz	48
2. Régulation de la différenciation des cellules à cristaux	48
3. Interaction entre Lz et des cofacteurs	50
III. Conclusion et perspectives	51
A. Rôles de Srp au cours de l'hématopoïèse embryonnaire	51
B. Modulation de l'activité des facteurs GATA par formation de complexes	52
1. Interactions entre facteurs GATA et Ets	52
2. Interactions entre facteurs GATA, bHLH et LIM	53
3. Fonction des bHLH au cours de l'hématopoïèse chez la Drosophile	55
 <u>CHATRITRE II : Etude du processus de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires</u>	 57
I. Introduction	57
A. Serpent et l'établissement des lignages	57
B. Gcm et Lz, les facteurs dits « lignage spécifiques »	57
II. Résultats : résumé	59
III. Résultats : publication	60
<i>Resolving embryonic blood cell fate choice in Drosophila : interplay of GCM and RUNX factors.</i>	
IV. Discussion	61
A. Dynamique de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires	61
B. Régulation de la ségrégation par gcm/gcm2 et lz	63

C. Régulation de l'expression et de l'activité de <i>gcm</i>	65
1. Régulation de la transcription de <i>gcm</i> : éléments <i>cis</i> -régulateurs	65
2. Maintien de l'expression de <i>gcm</i> : autorégulation	66
3. Régulation de l'activité de Gcm par des co-facteurs	67
D. Régulation de l'expression de <i>lz</i>	68
1. Régulation de la transcription de <i>lz</i> : éléments <i>cis</i> -régulateurs	69
2. Régulation de la transcription de <i>lz</i> : facteurs en <i>trans</i>	70
3. Influence de Ush sur <i>lz</i>	71
E. Recherche du signal inducteur de la ségrégation	72
1. Rôle de la prolifération	72
2. Rôle de la signalisation Notch	73
3. Influence du patterning de la tête	75
V. Conclusion	78
- DISCUSSION GENERALE -	80
I. Recherche de nouveaux régulateurs de l'hématopoïèse embryonnaire	80
II. Régulation de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire	81
III. Comparaison entre l'hématopoïèse chez la <i>Drosophile</i> et chez les vertébrés	83
A. La notion de cellule souche	83
B. Influence de l'environnement sur l'hématopoïèse	84
IV. Conclusion	85
- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -	86

Résumé en anglais

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Plasmacytes	2
Figure 2 : Cellules à cristaux	3
Figure 3 : Lamellocytes	3
Figure 4 : Cycle de développement de <i>Drosophila</i> et de <i>Leptopilina</i>	4
Figure 5 : Cascade de mélanisation chez les arthropodes	8
Figure 6 : La coagulation	11
Figure 7 : Les deux voies de régulation de la réponse humorale chez la Drosophile	14
Figure 8 : Schéma simplifié de la hiérarchie hématopoïétique chez les vertébrés	15
Figure 9 : Apparition séquentielle des sites d'hématopoïèse au cours du développement	17
Figure 10 : Hématopoïèse embryonnaire chez la Drosophile	18
Figure 11 : Représentation schématique des trois phases de migration des plasmacytes	18
Figure 12 : Structure de la glande lymphatique	21
Figure 13 : Répartition des hémocytes au stade larvaire	22
Figure 14 : Structure des facteurs de transcriptions GATA	23
Figure 15 : Régulation de l'hématopoïèse larvaire	34
Figure 16 : Alignement des doigts de zinc de type N- et C-terminaux des facteurs GATA de la Drosophile	36
Figure 17 : Structure du gène <i>serpent</i>	37
Figure 18 : Inactivation de <i>srp</i> par RNAi	41
Figure 19 : Les promoteurs des gènes hématopoïétiques contiennent plusieurs sites GATA	43
Figure 20 : Les mutants de <i>srp</i> et de <i>ush</i> ont des phénotypes cuticulaires similaires	44
Figure 21 : Les promoteurs de <i>dox43</i> et <i>pro-PO</i> contiennent des sites GATA et RUNX	48
Figure 22 : Régulation de la différenciation des cellules à cristaux	49
Figure 23 : Régulation de l'activité de GATA-1 par le facteur Ets PU.1	52

Figure 24 : Régulation de l'activité de Pnr par les facteurs Chip et Ac/Da	54
Figure 25 : Patron d'expression de <i>CG17100</i> au cours de l'embryogenèse	55
Figure 26 : Expériences de lignage dans les cellules à cristaux	61
Figure 27 : Cinétique d'apparition des progéniteurs Lz+ et des plasmotocytes	62
Grphe 1 : Prolifération des cellules Lz+	62
Figure 28 : <i>gcm</i> et <i>gcm2</i> sont des inhibiteurs de la différenciation en cellules à cristaux	64
Figure 29 : Les prohémocytes sont des précurseurs bipotents	64
Figure 30 : Expression précoce de <i>gcm</i> au niveau du territoire hématopoïétique	66
Figure 31 : Régulation de l'expression de <i>gcm</i> par <i>srp</i>	66
Figure 32 : Représentation schématique du promoteur de <i>lz</i>	69
Figure 33 : Régulation de l'expression de <i>ush</i> par <i>gcm/gcm2</i>	72
Figure 34 : Influence de la prolifération	73
Figure 35 : Visualisation de l'induction de la voie Notch au stade embryonnaire	74
Figure 36 : Influence de Notch sur la formation des hémocytes	74
Figure 37 : Position du domaine de formation des prohémocytes par rapport à la segmentation de la tête	76
Figure 38 : Influence des gènes du patterning de la tête sur la formation des hémocytes	77
Figure 39 : Expression de différents marqueurs au stade embryonnaire et dans la glande lymphatique	82

- INTRODUCTION -

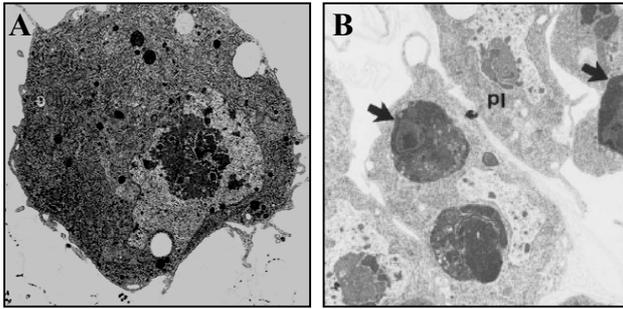
I. Les cellules sanguines : description et fonctions

Chez les mammifères, il existe plusieurs types de cellules sanguines spécialisées, communément regroupés en trois catégories dans les traités d'histologie : les hématies, aussi appelées érythrocytes ou globules rouges, les leucocytes ou globules blancs et enfin les plaquettes. Les leucocytes sont subdivisés en deux autres catégories selon l'aspect de leurs noyaux : (i) les cellules mononuclées correspondent aux lymphocytes et aux monocytes ; (ii) les polynucléaires ou granulocytes, dont le noyau est plurilobé et qui correspondent aux éosinophiles, aux basophiles et aux neutrophiles qui est le type sanguin le plus abondant.

Chez les vertébrés, ces nombreux types cellulaires assurent le support de deux fonctions fondamentales :

- (1) Les hématies assurent le transport des gaz respiratoires. Cette fonction est essentielle à l'oxygénation des cellules et à l'élimination du gaz carbonique, déchet principal de l'activité cellulaire.
- (2) Les leucocytes et les plaquettes assurent le maintien de l'intégrité de l'organisme. D'une part, les plaquettes, générées par les mégacaryocytes, colmatent les lésions endothéliales en formant des amas appelés thrombus ou caillots. D'autre part, les leucocytes assurent, par leurs spécificités propres, les fonctions de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Deux catégories de leucocytes sont présentes dans l'organisme : (i) les leucocytes macrophagiques qui assurent la réponse immunitaire innée, ces cellules correspondent notamment aux monocytes qui se différencient en macrophages ; (ii) les lymphocytes qui assurent la fabrication des anticorps et sont responsables de la réponse immunitaire dite adaptative. La réponse immunitaire adaptative est caractérisée par l'existence de réarrangements somatiques des gènes qui codent pour les récepteurs immunitaires et par l'expansion clonale et l'activation des lymphocytes.

Chez les insectes, plusieurs types de cellules sanguines, désignés par le terme générique d'hémocytes, sont présents dans l'hémolymphe. Cependant, la diversité des types cellulaires est beaucoup moins élevée que chez les vertébrés. Ainsi, chez la *Drosophile*, seuls trois types de cellules sanguines sont décrits : les plasmatocytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes. Les hémocytes ont des rôles essentiels au cours du développement et dans la



D'après Meister, Lagueux, 2003

D'après Lanot et al., 2001

Figure 1 : Plasmatocytes. (A,B) Plasmatocytes (PI) observés par microscopie électronique à transmission. Les plasmatocytes sont caractérisés par la présence de phagosomes dans leur cytoplasme (flèches).

défense de l'organisme. Bien que les cellules sanguines des vertébrés et de la *Drosophile* aient des fonctions similaires, il existe plusieurs différences entre ces deux systèmes. Notamment, il faut noter que, contrairement aux vertébrés, chez la *Drosophile* et chez les insectes en général, les cellules de l'hémolymphe n'assurent pas la fonction d'oxygénation qui est assurée par diffusion passive depuis les trachées. De plus, les insectes ne possèdent qu'une immunité innée, et sont dépourvus d'immunité adaptative.

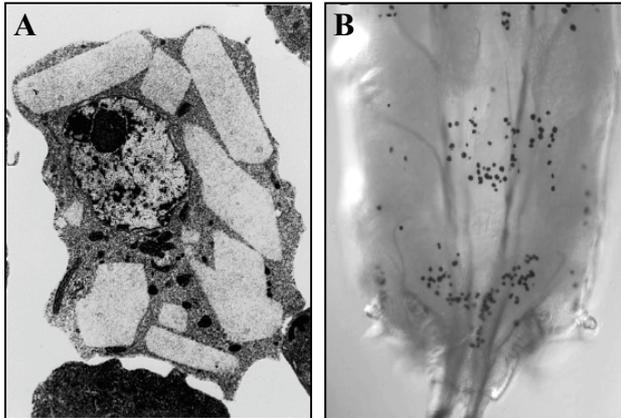
Le système circulatoire de la *Drosophile* est un système ouvert, l'hémolymphe circule donc librement entre les cellules. Chez la *Drosophile*, les plasmatoctes et les cellules à cristaux sont présents dans l'hémolymphe dès le stade embryonnaire, les lamellocytes apparaissent seulement en fin de vie larvaire. Aux stades larvaire et adulte, le flux de l'hémolymphe dans l'organisme est assuré par les contractions rythmiques du vaisseau dorsal, l'équivalent du cœur chez les vertébrés et par les mouvements de l'individu.

Dans ce premier chapitre, je présenterais dans un premier temps les trois types cellulaires de la *Drosophile*, plasmatoctes, cellules à cristaux et lamellocytes, puis leurs fonctions au cours du développement et de la réponse immunitaire.

A. Description des cellules sanguines chez la *Drosophile*

1. Les plasmatoctes

Les plasmatoctes sont des cellules de 10 à 15 μm de diamètre, représentant environ 95% des hémocytes circulants au stade embryonnaire et au stade larvaire. La présence de ces cellules a aussi été détectée au stade adulte. Les plasmatoctes sont les seuls hémocytes à avoir une activité de phagocytose. Ces hémocytes sont apparentés à des macrophages dont ils ont les caractéristiques fonctionnelles et structurales (Lanot et al., 2001; Meister and Lagueux, 2003). Ils sont notamment caractérisés par la présence dans leur cytoplasme de nombreux lysosomes, de phagosomes (vacuoles de phagocytose) et de corps de résorption, qui traduisent une activité phagocytaire importante (Figure 1). D'autre part, ces cellules synthétisent massivement des protéines de la matrice extra-cellulaire. Les plasmatoctes jouent un rôle



D'après Dearolf, 1998

Figure 2 : Cellules à cristaux. (A) Cellule à cristaux observée par microscopie électronique à transmission. Ces cellules contiennent des inclusions paracrystallines de prophénoloxydase. (B) Visualisation *in vivo* des cellules à cristaux dans la région postérieure d'une larve de troisième stade. Un traitement à la chaleur de 10 minutes à 60°C provoque le noircissement spécifique des cellules à cristaux qui sont alors visibles à travers la cuticule.

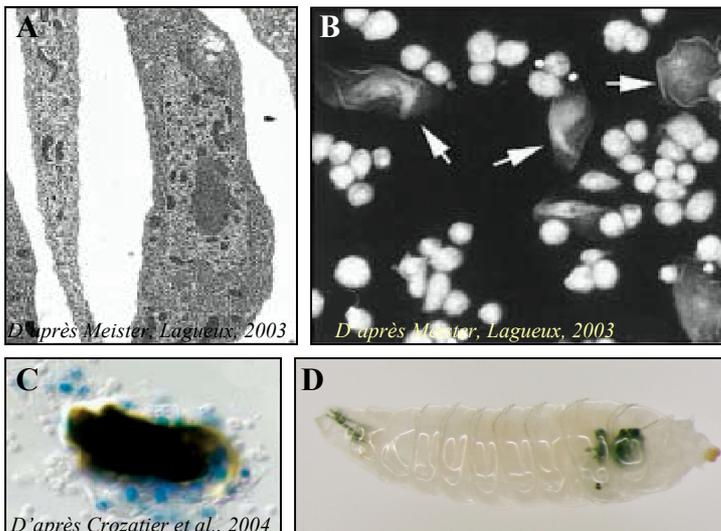


Figure 3 : Lamellocytes. (A) Lamellocytes dans la glande lymphatique observés par microscopie électronique à transmission. (B) Coloration au DAPI des hémocytes larvaires circulants. Les plasmatocytes correspondent aux cellules rondes, les lamellocytes correspondent aux cellules plus grosses et aplaties (flèches). (C) Encapsulation d'un œuf de guêpe *Leptopilina boulardi*. Les lamellocytes qui expriment le marqueur P-*lacZ* *l(3)06949* sont visualisés par coloration X-Gal. Les lamellocytes et les plasmatocytes entourent l'œuf parasite. (D) Larve sauvage *in toto* parasitée par *L. boulardi*. La capsule mélanique formée autour du parasite correspond à une structure inerte visible à travers la cuticule.

essentiel au cours du développement en remodelant les tissus et participent également à l'immunité cellulaire en phagocytant les agents infectieux.

2. Les cellules à cristaux

Les cellules à cristaux apparaissent au stade embryonnaire et sont retrouvées en circulation au stade larvaire (Figure 2B). Elles représentent 5% des hémocytes. Les cellules à cristaux sont de grosses cellules rondes qui doivent leur nom à la présence de larges inclusions cristallines dans leur cytoplasme (Figure 2A) (Dearolf, 1998; Lanot et al., 2001). Ces inclusions sont supposées correspondre aux enzymes, telles que les prophénoloxydases et aux substrats nécessaires au processus de mélanisation. La mélanisation correspond à un processus de défense propre aux insectes.

3. Les lamellocytes

Les lamellocytes sont des cellules de grande taille (40 à 50 μm de diamètre) de forme aplatie (Figure 3A, B). Les lamellocytes sont requis pour l'encapsulation de corps étrangers trop gros pour être phagocytés par les plasmotocytes. Ces hémocytes sont décrits comme des cellules incapables de phagocytose (Lanot et al., 2001).

Ce type cellulaire n'est pas présent en condition normale. La différenciation de ce lignage est induite au stade larvaire, dans certaines conditions, notamment lors d'un parasitisme par la larve de guêpe *Leptopilina boulardi*. Cet hyménoptère endoparasitoïde avirulent pond ses œufs à l'intérieur de l'hémocoel des larves de *Drosophile* de stade L2. Les larves de souches résistantes éliminent le parasite par formation d'une capsule mélanique autour du parasite (Figure 3C, D). La formation de cette capsule ne perturbe pas le développement de l'hôte qui se poursuit alors jusqu'au développement de la mouche adulte. Cependant, si l'œuf parasite échappe au système immunitaire de l'hôte, la larve de guêpe éclôt et se développe à l'intérieur de la larve de *Drosophile*. La larve de *Drosophile* entre en métamorphose mais meurt avant d'achever son cycle de développement et une guêpe adulte sort de la puppe (Figure 4) (Carton and David, 1985; Russo et al., 1996).

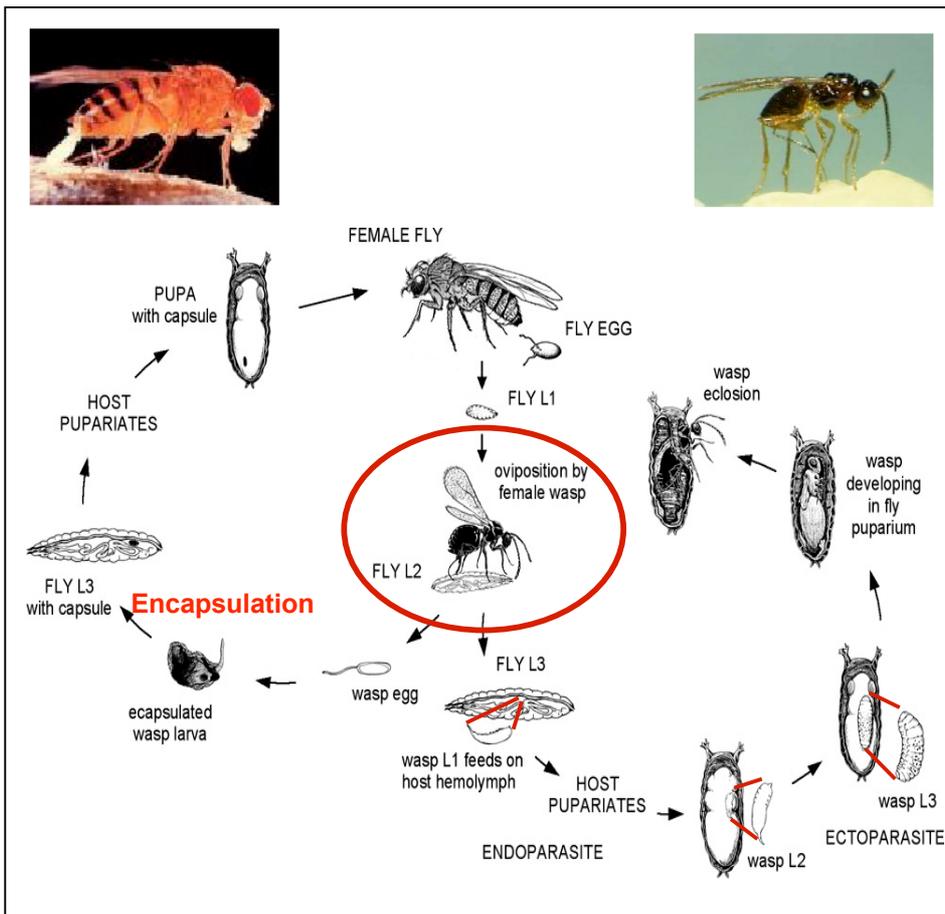


Figure 4 : Cycle de développement de *Drosophila* et de *Leptopilina*

B. Fonctions des hémocytes

Chez les insectes, les cellules sanguines présentes dans l'hémolymphe sont le support de deux fonctions fondamentales : (1) les hémocytes jouent un rôle essentiel au cours du développement, notamment en remodelant les tissus par dépôt de matrice extra cellulaire et élimination des corps apoptotiques ; (2) les cellules sanguines participent à la défense de l'organisme lors d'un challenge immun. Les hémocytes sont responsables de la composante cellulaire de la réaction immunitaire.

1. Rôle des hémocytes lors du développement de l'organisme

1.1 Phagocytose des corps apoptotiques

Au cours du développement, un certain nombre de cellules vont rentrer en apoptose. La première vague d'apoptose a lieu dès le stade 11 de l'embryogenèse (Abrams et al., 1993). Puis au cours du développement de l'organisme, des vagues successives d'apoptose interviennent, notamment, lors de la métamorphose lorsque la majorité des tissus larvaires sont histolysés et que les structures adultes se développent à partir des disques imaginaux (pour revue (Bangs and White, 2000)). Les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose par les plasmatoctes/macrophages (pour revue (Bangs et al., 2000)). A la fin de l'embryogenèse, environ 700 plasmatoctes sont répartis dans tout l'embryon. Des travaux ont montré que le nombre de plasmatoctes ne varie pas en fonction du taux d'apoptose dans l'embryon (Tepass et al., 1994). A la fin de l'embryogenèse, 90 à 95 % des plasmatoctes ont une activité phagocytaire, ce nombre peut augmenter jusqu'à 100% en présence d'un excès de corps apoptotiques. Ces données indiquent qu'en condition normale, les plasmatoctes ne sont pas tous au même stade de maturation. De plus, ces résultats suggèrent que la présence de corps apoptotiques induit l'activité phagocytaire des plasmatoctes et leur différenciation terminale en macrophage. Au stade larvaire, les plasmatoctes sont présents en circulation dans l'hémolymphe et représentent environ 95% des hémocytes circulants (Holz et al., 2003). Il est intéressant de noter qu'au cours de la vie larvaire, les plasmatoctes prolifèrent et leur nombre augmente de manière importante (Holz et al., 2003; Lanot et al., 2001). Actuellement, on ne sait pas si tous les plasmatoctes sont capables de proliférer ou s'il existe des sous-populations spécifiquement dédiées à l'expansion de cette population.

Une étape critique de la phagocytose est la reconnaissance de la cible par les cellules macrophagiques. Ceci requiert l'expression, à la surface des plasmatoctes, de récepteurs spécifiques impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. En 1996, Franc et al. ont identifié le premier récepteur des corps apoptotiques chez la Drosophile, Croquemort (Crq) qui appartient la famille des récepteurs CD36. Crq est exprimé spécifiquement par les plasmatoctes dès le stade embryonnaire (stade 11) (Franc et al., 1996). La fonction de Crq a été étudiée *in vivo* au cours de l'embryogenèse (Franc et al., 1999). En absence de Crq, l'efficacité de phagocytose est diminuée et les auteurs ont montré que Crq est spécifiquement impliqué dans la phagocytose des corps apoptotiques mais pas des bactéries. Au stade larvaire et au stade puppe, Crq est aussi exprimé à la surface des plasmatoctes (Franc et al., 1999; Lebestky et al., 2000) mais la fonction de ce récepteur n'a pas été étudiée à ces stades du développement de la mouche.

Chez *Caenorhabditis elegans* deux voies de signalisation impliquées dans l'induction de la phagocytose ont été génétiquement identifiées. Bien que les récepteurs responsables de l'induction de ces voies soient encore mal connus, il a été proposé que CED-1 soit le récepteur responsable de l'induction de l'une des voies. L'autre voie pourrait être induite par le récepteur de surface PSR-1, homologue des gènes codant pour les récepteurs macrophagiques de type PSR (phosphatidylserine receptor) chez les mammifères. Crq n'est l'homologue structural ni de CED-1, ni de PSR-1. La recherche d'un homologue de CED-1 chez la Drosophile a conduit à l'identification d'un second récepteur des cellules apoptotiques, le récepteur Draper. Au stade embryonnaire, Draper est exprimé dans les plasmatoctes (Freeman et al., 2003) et en condition perte de fonction de *draper* on observe une diminution de la phagocytose des corps apoptotiques *in vivo* (Manaka et al., 2004). Par ailleurs, Draper est exprimé dans les cellules l(2)mbn, dérivées des macrophages larvaires. L'étude de la fonction de ce récepteur dans ces cultures cellulaires a permis de mettre en évidence que Draper participe à l'activité phagocytaire des macrophages selon un mécanisme de phagocytose indépendant de Crq (Manaka et al., 2004). Cependant, comme pour Crq, le rôle de Draper aux stades larvaires et pupal n'a pas été analysé *in vivo*.

D'autres récepteurs pourraient intervenir dans la reconnaissance des corps apoptotiques chez la Drosophile : le récepteur PSR (phosphatidylserine receptor) et le récepteur dSR-CI. Chez les mammifères, la phagocytose des corps apoptotiques semble passer par la reconnaissance de phosphatidylserines. Cette donnée a conduit à l'identification d'un récepteur de type PSR chez la Drosophile, par homologie de séquence avec les

récepteurs de phosphatidylserines des mammifères (Fadok et al., 2000). D'autre part, un quatrième récepteur des corps apoptotiques, dSR-CI, a été identifié à partir de cellules en culture de type Schneider S2 dérivées de macrophages larvaires. Ce récepteur est l'homologue des récepteurs scavenger SR-A des mammifères. Il a été montré que dSR-CI est exprimé dans les hémocytes embryonnaires (Pearson et al., 1995). Cependant, les rôles respectifs de ces deux récepteurs, PSR et dSR-CI n'ont, à ce jour, pas encore été analysés *in vivo*. L'analyse de la fonction de ces différents récepteurs *in vivo* et *in vitro* permettra de mieux comprendre quels sont les mécanismes de reconnaissance des corps apoptotiques par les cellules macrophagiques.

L'élimination rapide des cellules apoptotiques est un élément important étant donné que les corps apoptotiques persistants peuvent libérer des substances cytotoxiques et endommager les tissus voisins. De plus, il a été montré que l'activité phagocytaire des plasmatoctes est cruciale pour remodeler certains tissus. Ainsi en fin d'embryogenèse, le système nerveux central (SNC) subit une vague d'apoptose qui permet l'élimination de cellules gliales et de neurones. Dans un mutant *pvr* ou *crq*, où la migration des plasmatoctes ou leur activité macrophagique sont respectivement altérées, la morphogenèse du SNC est aberrante. Ces données montrent que la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages est essentielle pour la morphogenèse du SNC, notamment pour le positionnement correct des cellules gliales et la formation de l'échelle d'axones (Sears et al., 2003).

On peut noter qu'au début de la métamorphose, sous l'effet de l'ecdysone, les plasmatoctes subissent des modifications structurales et fonctionnelles importantes. Ces macrophages pupaux sont impliqués dans la phagocytose des tissus larvaires histolysés (Lanot et al., 2001).

1.2 Synthèse de matrice extra cellulaire

Une des caractéristiques des plasmatoctes, outre leur activité macrophagique, est de synthétiser de la matrice extra-cellulaire. Les plasmatoctes synthétisent notamment plusieurs protéines structurales de la matrice extra-cellulaire comme la Tigrine (Fogerty et al., 1994), la Peroxydasine (Pxn) (Nelson et al., 1994), la Papiline (Kramerova et al., 2003) et deux

molécules de type Collagène IV, Viking (Vkg) (Freeman et al., 2003) et Cg25C (Paladi and Tepass, 2004).

Cette activité de synthèse participe au remodelage des tissus au cours de l'embryogenèse. Ainsi, la corde nerveuse ventrale (VNC) subit une phase de condensation (diminution de la taille et augmentation de la densité cellulaire). Cette étape est indépendante de l'apoptose. Lorsque la migration des plasmatoctes est bloquée dans un contexte mutant *pvr* ou *rac*, on ne détecte pas ou peu de matrice extra-cellulaire (Pxn et Vkg) déposée autour des organes internes. Ce défaut de dépôt de matrice extra-cellulaire est associé à un phénotype de condensation partielle de la corde nerveuse centrale. Ces données suggèrent donc que cette étape de remodelage tissulaire dépend du dépôt de matrice extra-cellulaire par les plasmatoctes (Olofsson and Page, 2005).

Les plasmatoctes ont donc une fonction cruciale au cours du développement de l'organisme. Cependant, l'ensemble des hémocytes, plasmatoctes, cellules à cristaux et lamellocytes ont aussi une seconde fonction fondamentale puisqu'ils assurent le support de la réponse immunitaire cellulaire.

2. La réponse immunitaire chez la *Drosophile*

Chez les arthropodes, les mécanismes de défense de l'organisme sont extrêmement efficaces et reposent exclusivement sur une immunité innée. En effet, l'immunité adaptative, c'est-à-dire la production d'anticorps par les lymphocytes, est évolutivement récente, et n'est présente que chez les vertébrés. Les insectes et notamment la *Drosophile* sont particulièrement résistants aux infections microbiennes. La *Drosophile* possède un système de défense contre l'invasion par des microorganismes qui repose sur plusieurs facettes. La barrière épithéliale sert de première défense contre l'entrée de microorganismes. Lors d'une infection, deux types de réponses immunitaires sont déclenchés : une réponse cellulaire assurée par les hémocytes qui implique des processus de phagocytose, de mélanisation et d'encapsulation (pour revues (Meister, 2004; Meister and Lagueux, 2003)) et une réponse humorale assurée par les cellules du corps gras qui synthétisent et libèrent dans l'hémolymphe des peptides antimicrobiens et/ou antifongiques à large spectre d'action.

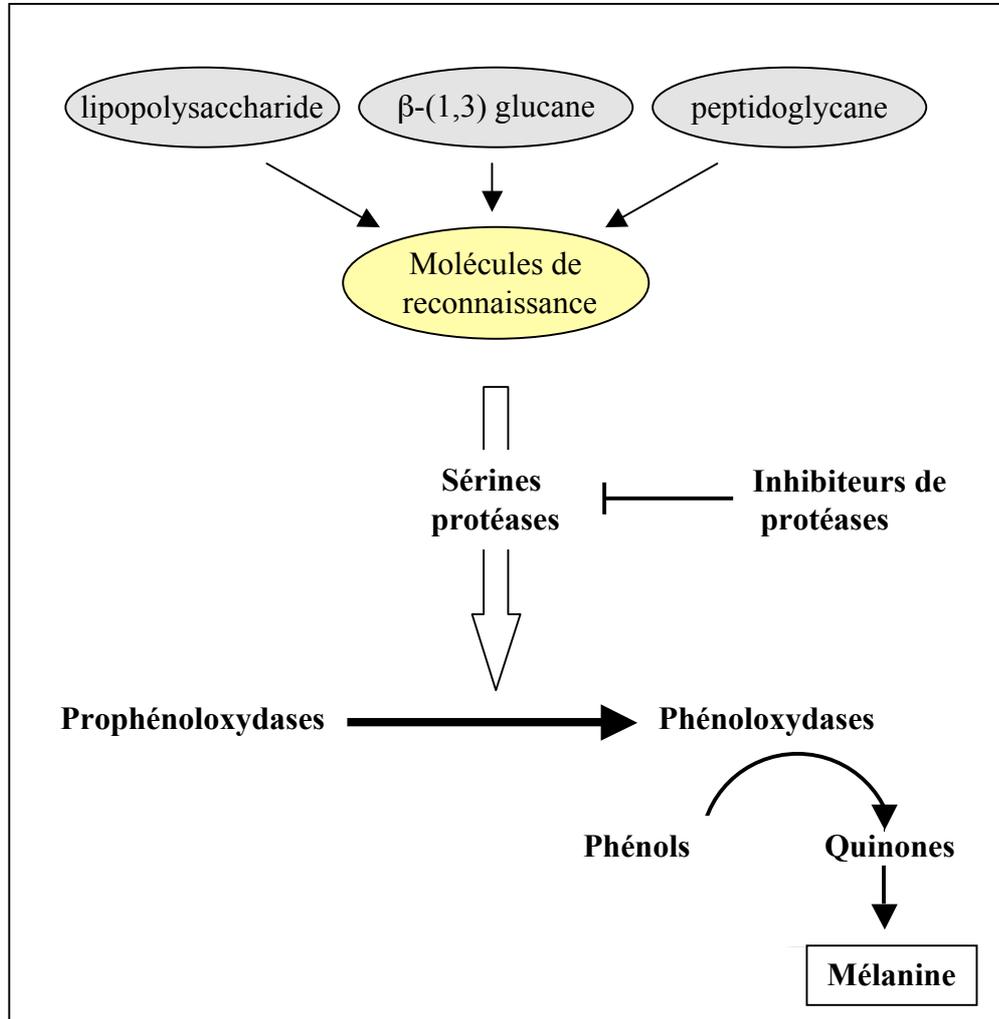


Figure 5 : Cascade de mélanisation chez les arthropodes. (Représentation simplifiée, d'après Söderhall et Cerenius, 1998) La reconnaissance de motifs microbiens induit une cascade d'activation de sérines protéases qui permet l'activation des phénoloxydases, responsables de la synthèse de mélanine.

2.1 La réponse cellulaire

✓ *La phagocytose des bactéries*

Lors d'une infection par un agent pathogène, la première ligne de défense repose sur la reconnaissance du corps étranger par les hémocytes circulants. Trois récepteurs membranaires impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des bactéries sont exprimés à la surface des plasmotocytes : dSR-CI (Pearson et al., 1995), PGRP-LC (Ramet et al., 2002) et Eater (Kocks et al., 2005). Bien que les rôles de dSR-CI et de PGRP-LC n'aient pas été étudiés *in vivo*, il a été montré en culture cellulaire sur des cellules Schneider S2, que dSR-CI, déjà mentionné dans le paragraphe précédent, est impliqué dans la reconnaissance des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Ramet et al., 2001). Dans le même contexte d'étude, des données suggèrent que PGRP-LC (Peptidoglycan recognition protein LC) est spécifiquement impliqué dans la phagocytose des bactéries à Gram négatif. Le troisième récepteur, Eater, est exprimé spécifiquement dans les macrophages. La fonction de Eater a été analysée *in vivo*, et les résultats mettent en évidence que ce récepteur est impliqué dans la phagocytose des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Kocks et al., 2005). Ces trois récepteurs participent donc à la reconnaissance et à la phagocytose des bactéries en fonction de leurs propriétés de reconnaissance des bactéries à Gram positif et/ou à Gram négatif.

✓ *La mélanisation*

La mélanisation est une réaction de défense spécifique des insectes. Cette réaction correspond à la production de mélanine, un pigment noir facilement visible. La production de mélanine est observée dans différents contextes immuns. Par exemple, lorsque la *Drosophile* est blessée, c'est-à-dire lorsqu'une faille dans la cuticule est provoquée, on observe un dépôt de mélanine au niveau de la blessure. De même, lors d'un parasitisme par exemple par *L. boulandi*, l'œuf parasite est encapsulé puis mélanisé (voir ci-dessous).

La mélanisation correspond à une réaction enzymatique contrôlée par une cascade de sérines protéases qui aboutit à la production de mélanine (Figure 5). Les phénoloxydases (PO) sont normalement présentes dans l'hémolymphe à l'état inactif de prophénoloxydases (PPO). Ce zymogène inactif est clivé en une forme active PO par une sérine protéase PPAE

(prophenoloxdase activating enzyme). Cette PPAE est elle-même présente sous forme de zymogène inactif et est activée par une cascade de serines protéases. Les phénoloxdases catalysent l'oxydation des phénols en quinones qui polymérisent alors de manière non-enzymatique pour former la mélanine (pour revue (Soderhall and Cerenius, 1998)). Chez la Drosophile, la cascade de mélanisation est contrôlée par la Serpine 27A (Spn27A) qui régule l'activation de la PPO par inhibition spécifique de la serine protéase PPAE. Ainsi, la perte de fonction de *spn27A* induit une mélanisation incontrôlée de l'hémolymph suite à une blessure alors que l'injection d'une forme activée de Spn27A réduit fortement la production de mélanine (De Gregorio et al., 2002; Kramerova et al., 2003).

L'activité des prophénoloxdases est détectée dans l'hémolymph. La relation entre ces prophénoloxdases et les hémocytes n'est pas claire et dans la littérature, la mélanisation est parfois considérée comme une réponse humorale et non comme une réponse cellulaire. Cependant plusieurs données montrent que les PPO sont synthétisées par les cellules à cristaux puis libérées dans l'hémolymph. Ainsi, dans un contexte mutant *Black cell (Bc)*, on observe une mélanisation précoce des inclusions cristallines des cellules à cristaux, ces cellules noircissent alors et meurent. Dans ce contexte, des tests biochimiques montrent que l'activité phénoloxdase de l'hémolymph est fortement réduite voire nulle (Braun et al., 1998). De manière similaire, dans un mutant *lozenge (lz)*, il n'y a pas de formation de cellules à cristaux et aucune mélanisation n'est observée suite à une blessure (Galko and Krasnow, 2004; Rizki et al., 1985). Ces données suggèrent donc que les enzymes nécessaires pour la mélanisation sont synthétisées par les cellules à cristaux puis libérées dans l'hémolymph.

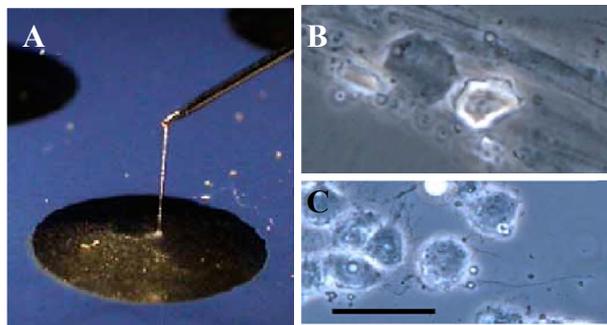
Les cellules à cristaux sont présentes dès le stade embryonnaire, cependant à ce stade leur fonction est inconnue. Au stade larvaire, ces cellules, retrouvées en circulation, semblent participer à la réaction immunitaire et à la réparation des blessures par mélanisation (Braun et al., 1998; Carton and Nappi, 1997; De Gregorio et al., 2002).

Il a été proposé que la mélanisation participe à la mort des pathogènes car plusieurs composés intermédiaires (radicaux libres, anions superoxydes, peroxyde d'hydrogène,...) produits lors de la synthèse de la mélanine sont potentiellement cytotoxiques. Cependant, il existe peu de données expérimentales qui mettent en évidence le rôle de la mélanisation dans l'élimination des pathogènes.

Lors d'un parasitisme par *L. bouhardi*, en condition sauvage, une capsule est formée autour de l'œuf parasite (voir ci-après) puis cette capsule est mélanisée. Dans un contexte mutant où la cascade de mélanisation est bloquée (mutant Spn27A^{activé}) ou dans le mutant *Bc* qui affecte spécifiquement les cellules à cristaux, le parasite n'est pas détruit ce qui provoque la mort de l'hôte (De Gregorio et al., 2002; Nappi et al., 2005; Rizki et al., 1990). Ces résultats mettent en évidence d'une part, la nécessité de la cascade de phénoloxydase dans la mélanisation de la capsule et la destruction du parasite et d'autre part, le rôle essentiel des cellules à cristaux dans ce processus. Ces données suggèrent donc que des défauts dans l'induction de la cascade de mélanisation conduisent à l'augmentation de la sensibilité de l'hôte aux infections.

Le rôle de la mélanisation dans la réponse immunitaire reste actuellement assez mal compris. De plus, on ne sait pas quels sont les mécanismes qui initient la réponse mélanique lors d'un challenge immun chez la Drosophile. Des études biochimiques menées, notamment chez la blatte *Blaberus discoidalis* et la Limulle *Limulus polyphemus* ou chez le ver à soie *Bombyx mori*, ont établi que le système PPO est activé par la présence de composants antimicrobiens, tels que les beta-1,3-glucans, les lipopolysaccharides et les peptidoglycanes. Ceci permet l'induction de ce système seulement en présence de pathogènes (pour revue (Cerenius and Soderhall, 2004)).

Si le rôle de la mélanisation dans la lutte contre les pathogène est encore mal élucidé, une étude récente a mis en évidence le rôle essentiel de ce processus dans la réparation des blessures (Galko and Krasnow, 2004). Chez les vertébrés, de nombreuses études ont montré que la réparation des blessures est un processus complexe qui fait intervenir les cellules sanguines, en plus des cellules épithéliales et des fibroblastes. Notamment, les plaquettes participent à la formation d'un caillot au niveau des tissus endommagés et relarguent des chémokines qui attirent les neutrophiles et les monocytes responsables de la réponse inflammatoire précoce. Puis les kératinocytes sont activés à la marge de la blessure et restaurent l'intégrité de l'épithélium. Chez la Drosophile, au stade larvaire et adulte, suite à une blessure, une croûte se forme très rapidement (10 à 15 minutes après l'apparition de la blessure) et est recouverte de mélanine. Dans un second temps, les cellules épithéliales à la marge de la blessure migrent et fusionnent pour former un syncytium. La formation de la croûte et la ré-épithélialisation sont deux processus indépendants. Cependant, il semble que la formation de la croûte facilite la réparation de la blessure en stabilisant le site. En effet, en contexte mutant pour *lz*, la croûte ne se forme pas et, bien que la ré-épithélialisation soit



D'après Bidla et al. 2005

Figure 6 : La coagulation. (A) Goutte d'hémolymph de la *Drosophile*. (B,C) Hémocytes visualisés par microscopie à contraste de phase, hémocytes à l'intérieur (B) ou à l'extérieur (C) du caillot. Barre d'échelle 10µm.

initiiée, elle est souvent incomplète. Ces données montrent que l'activité des cellules à cristaux est requise pour la formation de la croûte. De plus, lors d'une blessure, l'hémolymphe se déverse dans le milieu extérieur. Dans un mutant *lz* ou *Bc*, la mortalité larvaire est augmentée et les larves qui survivent sont « flasques ». La formation de la croûte mélanisée semble donc importante pour maintenir une barrière physique hémostatique. De plus la formation de cette barrière protège l'individu contre l'entrée de bactéries.

D'autre part, au stade larvaire, suite à une blessure, les plasmatoctes circulants sont recrutés au niveau du site pour phagocyter les fragments cellulaires. La ré-épithélialisation est liée à l'activation de la voie JNK qui permet la migration des cellules épithéliales (Galko and Krasnow, 2004). Il est proposé que cette voie de signalisation soit responsable de l'information transmise aux plasmatoctes circulants et permette leur recrutement sur le site de la blessure.

✓ *La coagulation*

En réponse à une blessure, outre la formation d'une barrière mélanique, on observe aussi un phénomène de coagulation de l'hémolymphe (Figure 6). Ce phénomène permet de limiter les pertes de fluide et de piéger les microbes en bloquant leur entrée dans l'hémocoel. La coagulation est un mécanisme de défense largement répandu dans le règne animal. Bien que les mécanismes de coagulation soient relativement bien décrits chez certains arthropodes, peu de données existent sur ce processus chez la *Drosophile*. Des études récentes suggèrent que les hémocytes participent à la formation du caillot (Bidla et al., 2005; Scherfer et al., 2004). Récemment, une protéine secrétée, Hémolectine (d-Hml), a été identifiée à partir de cellules Kc167 dérivées d'hémocytes embryonnaires. d-Hml possède des domaines protéiques similaires au facteur humain von Willebrand factor (VWF), aux facteurs de coagulation V/VIII, et aux protéines du complément (Goto et al., 2001). *In vivo*, cette protéine est exprimée dans les cellules à cristaux et dans une sous-population de plasmatoctes larvaires, mais d-Hml n'est pas exprimé par les lamellocytes (Goto et al., 2001). L'inactivation de *hml* par RNAi provoque un défaut de coagulation sans affecter la mélanisation ultérieure du caillot. D'autre part, la perte de fonction de *hml* ne modifie pas la production de peptides antimicrobiens (Goto et al., 2003).

L'ensemble de ces données suggère que les hémocytes participent au phénomène de coagulation. Cependant le manque de données ne permet pas encore de comprendre quelles

sont les interactions entre les hémocytes et les facteurs humoraux au cours de la formation du caillot.

Il est important d'insister sur une donnée surprenante concernant l'expression de d-Hml. En effet comme précisé précédemment, *hml* est exprimé dans les cellules à cristaux et une sous-population de plasmatoctes. Ceci soulève donc une question essentielle : Existe t'il plusieurs populations de plasmatoctes ?

✓ *L'encapsulation de gros parasites*

En réponse à un parasitisme, par exemple par la larve de guêpe *Leptopilina boulardi*, le parasite est recouvert par une capsule mélanique (Figure 3C, D). Dans ce contexte immun, on observe l'apparition de lamellocytes alors qu'en condition normale, ces cellules ne sont pas ou peu présentes. Les lamellocytes sont responsables de la formation d'une capsule autour de corps étrangers trop gros pour être phagocytés par les plasmatoctes.

Des études descriptives ont montré que la réaction immunitaire se déroule en plusieurs étapes lors d'une infection parasitaire et implique les trois populations de cellules sanguines, les plasmatoctes, les lamellocytes et les cellules à cristaux. Tout d'abord, le parasite est reconnu et recouvert par les plasmatoctes en circulation (Russo et al., 1996). Quelques heures après, une production massive de cellules à cristaux et de lamellocytes est observée en réponse à cette infection (Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002). Les lamellocytes vont alors rapidement s'accumuler dans l'hémolymphe puis recouvrir le parasite en formant plusieurs couches. Les lamellocytes vont former une capsule autour du parasite, puis, cette capsule est mélanisée en partenariat avec les cellules à cristaux. On imagine que le parasite meurt alors par asphyxie et/ou par la production locale de radicaux cytotoxiques (Nappi et al., 1995; Nappi et al., 2000). La capsule reste ensuite une structure inerte qui n'affecte pas le développement de la *Drosophile*.

Ces observations soulèvent plusieurs questions : quels sont les mécanismes qui permettent la reconnaissance du parasite par ces hémocytes circulants ? Quels sont les mécanismes qui induisent la production massive de cellules à cristaux et de lamellocytes en réponse au parasitisme ?

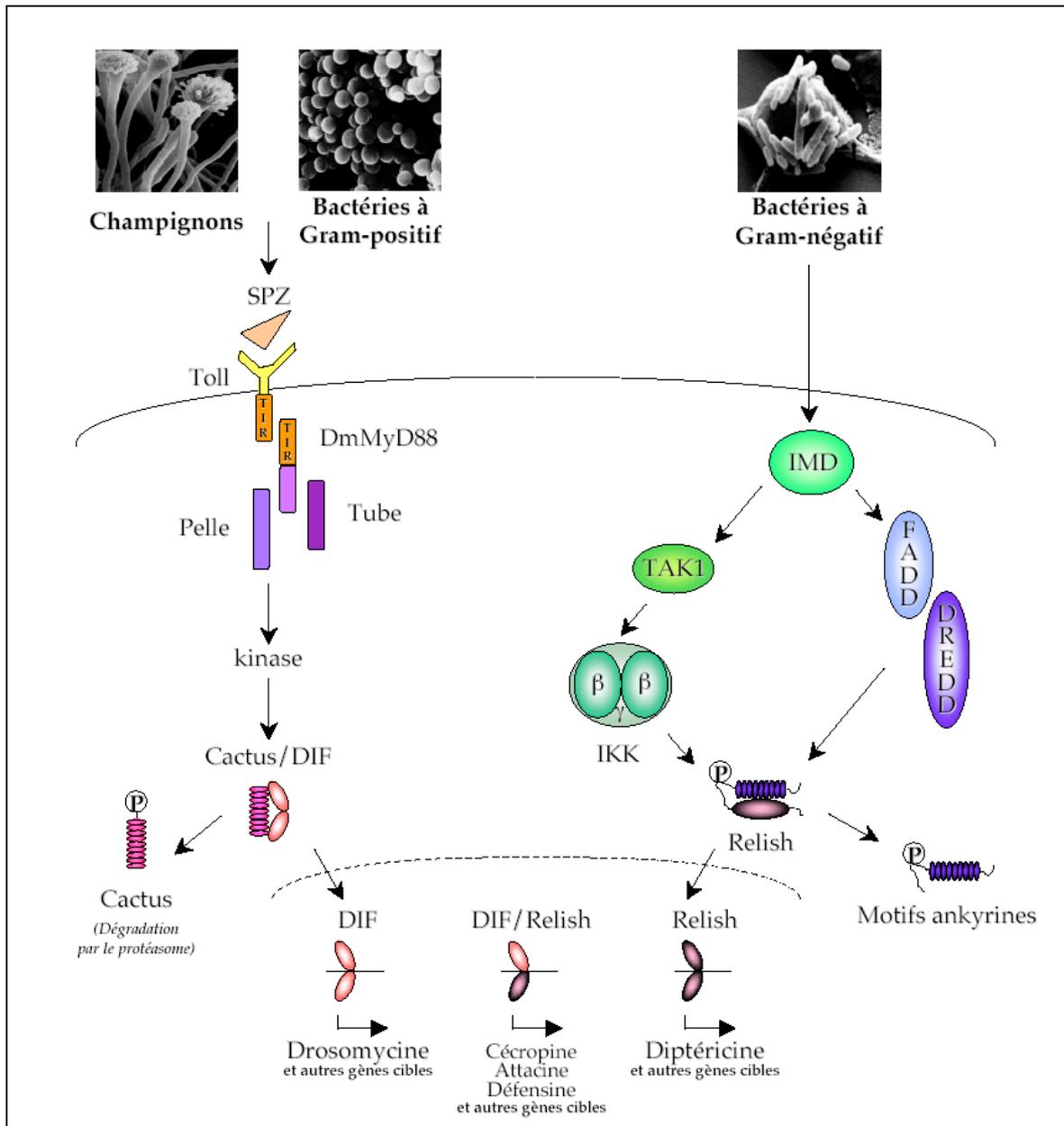
Récemment, Williams et al. ont complété la description de cette dynamique de réponse au parasitisme et mis en évidence que cette réponse implique une communication

entre les trois types cellulaires (Williams et al., 2005). En effet, dans un mutant *Rac*, l'encapsulation du parasite est aberrante et la capsule n'est pas mélanisée. Dans ce contexte, les plasmatoctes adhèrent à l'œuf parasite, cependant, ils sont incapables de former des extensions de type filopodes et ne recouvrent pas entièrement le parasite. Ceci conduit à l'absence de formation de cloison qui correspond à une barrière physique entre l'œuf et l'hémocoèle. Normalement, après la formation de cette cloison par les plasmatoctes, les lamellocytes complètent la formation de la capsule. Dans un mutant *Rac*, les lamellocytes sont recrutés sur l'œuf, mais ces cellules ont une morphologie anormalement ronde et leur adhésion à la capsule est perturbée. Enfin, bien que le nombre de cellules à cristaux ne soit pas affecté dans ce contexte mutant, la mélanisation de la capsule n'a pas lieu. Ces données montrent que, dans un mutant *Rac*, les contacts cellules à cellules sont absents ce qui suggère l'importance des contacts entre cellules lors de la formation et de la mélanisation de la capsule. Comme *Rac* est impliqué dans le remodelage de l'actine, on ne sait pas si le défaut d'adhésion des lamellocytes est lié à l'absence de substrat formé par les plasmatoctes ou à une perturbation directe du cytosquelette des lamellocytes. De même, l'absence de mélanisation de la capsule peut signifier, soit que la fonction cellules à cristaux est affectée, soit que la formation d'une capsule correcte est nécessaire pour la mélanisation.

On peut noter que de nombreux mutants génèrent la formation de tumeurs mélaniques. Il a été proposé que ces tumeurs résultent de la production aberrante de lamellocytes de façon constitutive, qui s'agrègent alors entre eux dans une réaction de pseudo-encapsulation (Gateff, 1977; Gateff, 1994). Ces tumeurs peuvent également résulter d'une réaction « auto-immune » où des tissus larvaires endommagés sont encapsulés puis mélanisés (Watson et al., 1991).

2.2 La réponse humorale

En réponse à une infection, outre la réponse immunitaire cellulaire, une réponse humorale est déclenchée (pour revues (Naitza and Ligoxygakis, 2004)). Je ne présenterais que très brièvement cet aspect de la réponse immunitaire qui dépend principalement du corps gras. Suite à une infection, les cellules du corps gras vont synthétiser et libérer dans l'hémolymphe des peptides antimicrobiens. Sept familles de peptides antimicrobiens ont été caractérisées chez la *Drosophile*. Ces peptides peuvent être classés en trois groupes selon leur spectre



D'après Naitza, Ligoxygakis, 2004

Figure 7 : Les deux voies de régulation de la réponse humorale chez la *Drosophile*.

d'action. Les Défensines sont actives contre les bactéries à Gram positif, la Drosomycine et la Metchnikowine sont des peptides antifongiques, alors que les peptides Diptéricine, Attacine, Cécropine et Drosocine sont principalement actifs contre les bactéries à Gram négatif. Ces peptides antimicrobiens agissent en association pour bloquer la croissance des pathogènes en lysant leur membrane.

La production de ces peptides antimicrobiens par le corps gras est dépendante du type de microorganisme qui infecte la Drosophile. Cette induction différentielle est régulée au niveau génique par deux voies de signalisation de type NF- κ B, les voies Toll et IMD (Figure 7). La voie Toll est activée en réponse à une infection fongique ou par des bactéries à Gram positif, alors que la voie IMD est activée par des bactéries à Gram négatif.

Les mécanismes de reconnaissance des agents pathogènes qui permettent au système immunitaire de la Drosophile d'activer la voie adéquate restent mal caractérisés. La recherche des signaux responsables de l'activation de ces deux voies de signalisation permettra de répondre à cette question cruciale.

2.3 Relations entre la réponse cellulaire et la réponse humorale

De nombreuses questions restent en suspens concernant la réaction immunitaire chez la Drosophile. Notamment on ne connaît pas la nature des mécanismes qui permettent de détecter la présence de microorganismes et d'induire la synthèse de peptides antimicrobiens par les cellules du corps gras. Une des hypothèses est les cellules sanguines circulantes joueraient le rôle de sentinelles. Ces cellules seraient impliquées dans la fixation et la reconnaissance des microorganismes, puis libèreraient des molécules de signalisation dans l'hémolymphe. Dans un mutant *domino*, dans lequel le nombre d'hémocytes est fortement réduit, la réponse antifongique et antibactérienne n'est pas abolie (Braun et al., 1998), ce qui suggère que les cellules sanguines n'ont pas un rôle essentiel dans l'induction de la réponse humorale. Néanmoins, Agaisse et al. ont récemment montré que les hémocytes larvaires expriment le gène *upd3* qui code pour une cytokine de type Unpaired (Upd)-like. De plus, les auteurs ont montré que l'expression de *upd3* par les hémocytes est requise pour déclencher la réponse du corps gras à une blessure septique (Agaisse et al., 2003). Ces données suggèrent que les cellules sanguines ont un rôle important dans l'induction de la réponse humorale

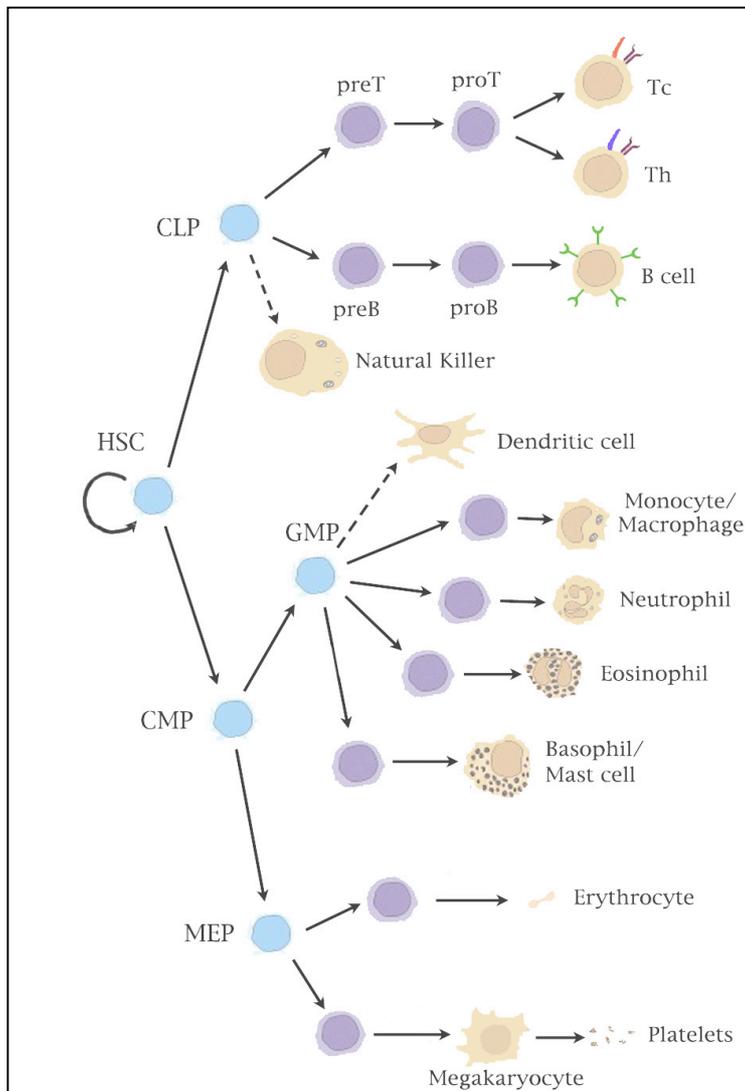


Figure 8 : Schéma simplifié de la hiérarchie hématopoïétique chez les vertébrés. L'hématopoïèse définitive chez les vertébrés va générer la totalité des lignages sanguins. Les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes vont générer deux types de progéniteurs, les progéniteurs lymphoïdes CLP et les progéniteurs myéloïdes CMP. Les CMP vont générer plusieurs types de progéniteurs à potentialités restreintes avant la différenciation des lignages sanguins matures. HSC : cellule souche hématopoïétique, CLP : progéniteur des cellules lymphoïdes, CMP : progéniteur des cellules myéloïdes, GMP : progéniteurs des granulocytes et macrophages, MEP : progéniteurs des mégacaryocytes et érythrocytes.

assurée par les cellules du corps gras et donc que les deux voies humorales et cellulaires sont étroitement liées.

II. L'hématopoïèse chez la *Drosophile*

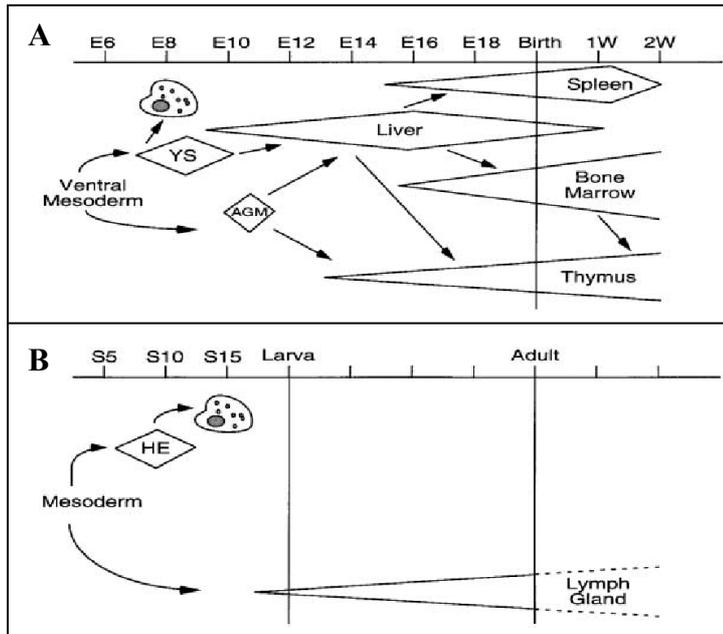
Les différentes populations de cellules sanguines d'un organisme sont générées au cours de l'hématopoïèse : des cellules précurseurs pluripotents vont proliférer et se différencier dans les multiples types cellulaires spécialisés qui composent le sang.

Chez les vertébrés, à partir d'une cellule souche pluripotente, la restriction progressive des potentialités des précurseurs va aboutir à l'établissement des différents types cellulaires. Selon le modèle couramment présenté, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) vont générer deux types de progéniteurs : le progéniteur lymphoïde, lui-même à l'origine des lymphocytes B et T, et le progéniteur myéloïde d'où sont issus les autres types sanguins, dont les érythrocytes, les mégacaryocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les monocytes/macrophages (pour revues (Kluger et al., 2004; Takagi, 2005)) (Figure 8). Cependant des études récentes remettent en question ce modèle jusqu'alors couramment admis. Ainsi, en 2006 Giebel et al. ont analysé *in vitro* le destin des cellules souches hématopoïétiques humaines par une approche au niveau d'une seule cellule et séparation des cellules filles par micromanipulation. Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'existence d'un progéniteur capable de générer à la fois des macrophages et des lymphocytes (Giebel et al., 2006). De manière similaire, les travaux d'Adolfsson et al. ont menés à la découverte de progéniteurs hématopoïétiques chez la souris et chez l'homme capables de générer des cellules lymphoïdes, des granulocytes et des macrophages mais incapables de générer les cellules du lignage érythro-mégakaryocytaire (Adolfsson et al., 2005). Ces résultats ne sont pas compatibles avec le modèle précédemment proposé. Dans ce contexte Adolfsson et al. proposent un nouveau modèle composite dans lequel les cellules souches hématopoïétiques, pendant leur engagement vers un destin progéniteur lymphoïde, perdent de manière séquentielle la capacité à former des érythrocytes/mégacaryocytes puis la capacité à générer des granulocytes/macrophages. En conclusion, la hiérarchie de l'hématopoïèse chez les vertébrés, établie depuis plusieurs années, vient d'être profondément remise en question. Ceci est lié, du moins en partie, à la difficulté de mener des analyses de lignage *in vivo* chez les vertébrés.

La comparaison de l'hématopoïèse entre la *Drosophile* et les vertébrés est difficile de par les différences de complexité et de fonction des différents lignages sanguins. Chez la *Drosophile*, comme chez tous les arthropodes, l'absence d'immunité adaptative assurée par les lymphocytes chez les vertébrés, suggère qu'il n'y a pas d'équivalent du lignage lymphoïde. D'autre part, les similitudes de fonctions, comme la phagocytose et la « cicatrisation », assurées par les hémocytes de la *Drosophile* et les cellules myéloïdes des vertébrés, font que l'on considère fréquemment que les cellules sanguines de la *Drosophile* sont similaires au lignage myéloïde des vertébrés en se basant sur l'ancien modèle de lignage des vertébrés.

A. Les processus hématopoïétiques

Chez les vertébrés, on distingue deux vagues d'hématopoïèses, appelées respectivement hématopoïèse primitive et hématopoïèse définitive (pour revue (Traver and Zon, 2002)). Chez la souris, les premières cellules souches hématopoïétiques (HSC) apparaissent peu après la gastrulation dans le mésoderme extra-embryonnaire du sac vitellin à E7.5 (jour 7.5 post-coïtum). Ces précurseurs hématopoïétiques apparaissent dans des structures nommées « îlots sanguins », dans lesquels les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques se différencient simultanément. Cette première vague d'hématopoïèse qui correspond à l'hématopoïèse primitive, mène à la formation de macrophages et, de manière majoritaire, à la formation d'érythrocytes primitifs transitoires dont le rôle présumé est d'assurer une oxygénation maximale de l'embryon. La seconde vague d'hématopoïèse, l'hématopoïèse définitive, se déroule au niveau de tissus embryonnaires et fœtaux. A E10.5 chez la souris, l'activité hématopoïétique est, dans un premier temps, localisée au niveau de l'AGM (région aorte/gonade/mésonephros) d'origine mésodermique. L'activité hématopoïétique de cette structure est transitoire et à E12 est dépourvue d'activité hématopoïétique. Les sites hématopoïétiques ultérieurs sont colonisés par des cellules HSC migrantes. Il est proposé que ces cellules HSC migrantes proviennent de l'AGM et la participation des cellules sanguines produites par le sac vitellin à l'hématopoïèse définitive n'a jamais été établie. Le foie fœtal devient le site hématopoïétique principal pendant la mi-



D'après Traver, Zon, 2002

Figure 9 : Apparition séquentielle des sites d'hématopoïèse au cours du développement. Ontogénie de l'hématopoïèse chez la souris (A) et chez la Drosophile (B). Les macrophages symbolisent la formation des cellules sanguines de type myéloïde lors de l'hématopoïèse primitive. YS : sac vitellin, AGM : région aorte/gonade/mésonephros, HE : anlage hématopoïétique. (Voir le texte pour les détails).

gestation, puis, rapidement, d'autres sites apparaissent : le thymus, la rate et, finalement, la moelle osseuse (Traver and Zon, 2002) (Figure 9A). L'hématopoïèse définitive permet de générer la totalité des lignages sanguins du fœtus et de l'adulte.

Chez les vertébrés, les cellules souches hématopoïétiques vont générer un grand nombre de lignages sanguins différents. L'hématopoïèse chez la *Drosophile* correspond à un système plus simple, en effet, les précurseurs de cellules sanguines (prohémocytes) se différencient en trois types cellulaires : les plasmacytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes. Cependant, comme chez les vertébrés, l'hématopoïèse chez la *Drosophile* se déroule en deux vagues successives, l'une au stade embryonnaire, la seconde au stade larvaire (Figure 9B).

1. L'hématopoïèse embryonnaire

La première vague d'hématopoïèse a lieu durant l'embryogenèse. Très tôt au cours du développement embryonnaire, au stade blastoderme (stade 5), environ 80 précurseurs hématopoïétiques, les prohémocytes, sont spécifiés au sein du mésoderme procéphalique (Holz et al., 2003; Rehorn et al., 1996). Ces cellules s'invaginent lors de la gastrulation au niveau du sillon ventral. Les prohémocytes commencent alors à migrer et, de manière simultanée, se différencient en deux types de cellules sanguines : plasmacytes et cellules à cristaux (Figure 10). De plus ces cellules vont proliférer. En 1989, l'analyse descriptive de la prolifération au stade embryonnaire a permis d'établir une carte des différents domaines mitotiques (Foe, 1989). La majorité des domaines mitotiques réalisent trois cycles de division entre le stade blastoderme et la fin de l'embryogenèse. Les hémocytes appartiennent à un domaine mitotique spécifique qui réalise quatre cycles de division.

Les plasmacytes qui représentent le lignage majoritaire (95% des hémocytes) apparaissent environ 2h après la gastrulation (stade 10) et expriment notamment un marqueur précoce, la Peroxidasine (Nelson et al., 1994; Tepass et al., 1994) et le récepteur des corps apoptotiques Croquemort (Franc et al., 1996). Au cours de l'embryogenèse, la majorité des plasmacytes vont acquérir des caractéristiques spécifiques des cellules macrophagiques

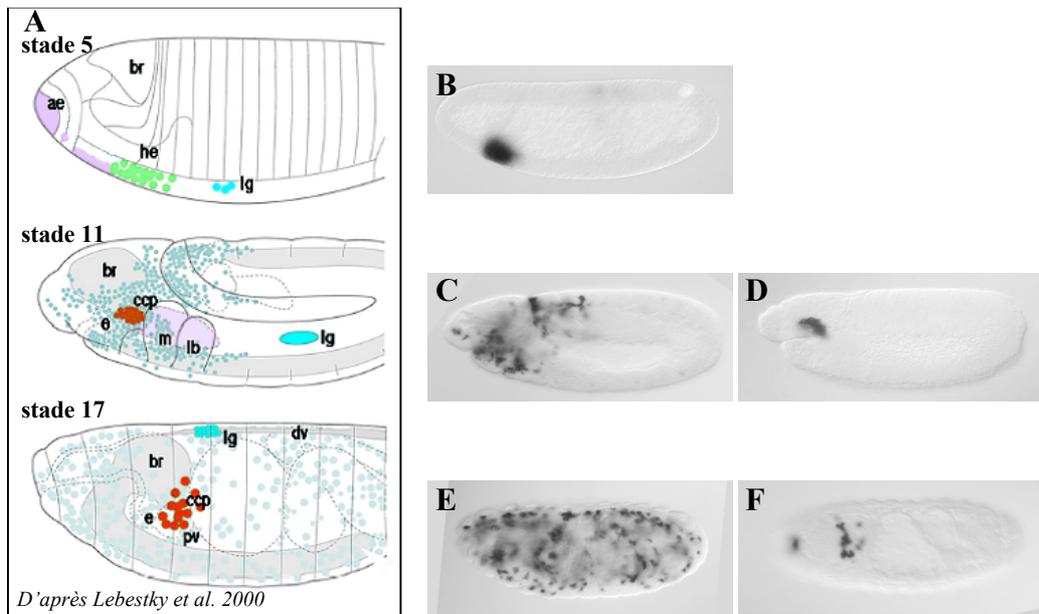


Figure 10 : Hématopoïèse embryonnaire chez la Drosophile. (A) Représentation schématique de l'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire. Embryons en vues latérales, antérieur à gauche, dorsal en haut. Au stade 5, les prohémostocytes (he, en vert) sont formés au niveau du mésoderme antérieur. Au stade 11, les plasmotocytes (en gris) commencent à migrer, les cellules à cristaux (ccp, en rouge) se différencient dans la région antérieure. Au stade 17, les plasmotocytes sont dispersés dans tout l'embryon, les cellules à cristaux restent localisées au niveau du proventricule (pv). Les précurseurs de la glande lymphatique (lg, en bleu) sont issus du mésoderme latéral au stade 5 puis migrent dorsalement. En fin d'embryogenèse, la glande lymphatique est située au niveau du vaisseau dorsal (dv). (B) Visualisation du territoire d'apparition des prohémostocytes par hybridation *in situ* contre *gcm*. (C,E) Marquage des plasmotocytes par visualisation de l'expression de *pxn* sur des embryons de stade 11 (C) et de stade 17 (E). (D,F) Marquage des cellules à cristaux par visualisation de l'expression de *dox43* sur des embryons de stade 11 (D) et de stade 17 (F).

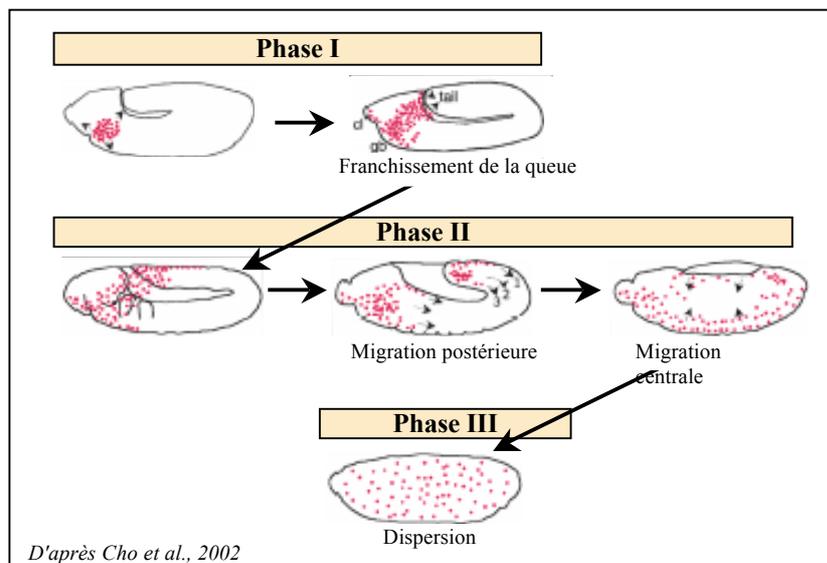


Figure 11 : Représentation schématique des trois phases de migration des plasmotocytes. (Voir le texte pour les détails)

(Tepass et al., 1994). Ces plasmatoctes matures sont aussi appelés macrophages. En fin d'embryogenèse, on dénombre environ 700 plasmatoctes répartis dans tout l'embryon.

Une des caractéristiques des plasmatoctes au stade embryonnaire est de coloniser l'ensemble de l'embryon en migrant selon des voies stéréotypées (Tepass et al., 1994). La migration des plasmatoctes peut être subdivisée en trois phases (Figure 11) : au cours de la phase I (stades 10 à 11), les plasmatoctes sont invaginés avec le sillon ventral et colonisent la région de la tête. Au cours de la phase II (stades 12 à 14), les plasmatoctes colonisent l'ensemble de l'embryon en migrant selon des routes stéréotypées : (i) ventralement, le long de la corde nerveuse ; (ii) dorsalement, les plasmatoctes franchissent la queue au stade 11 et lors de la rétraction de la bandelette germinative les plasmatoctes sont ramenés dans la région postérieure ; (iii) les plasmatoctes migrent le long de l'amnioséreuse et colonisent la région dorsale de l'embryon. Cette seconde phase de migration dépend du système de guidance PVR/PVF (Bruckner et al., 2004; Cho et al., 2002). Les plasmatoctes expriment le récepteur PVR (PDGF VEGF receptor) et les ligands chemoattractants VEGF sont exprimés le long des routes de migration et précèdent la migration des plasmatoctes. Cette migration est indépendante des sites d'apoptose (Cho et al., 2002; Sears et al., 2003). Au cours de cette phase de migration, les plasmatoctes étendent des protrusions cytoplasmiques très dynamiques (lamellipodes et filopodes). Rac1, qui agit en aval de PVR, est impliqué dans le contrôle de la formation des lamellipodes et dans le contrôle de la migration (Bruckner et al., 2004; Paladi and Tepass, 2004; Stramer et al., 2005). Lors de la phase III (stades 15 à 17), les plasmatoctes répartis dans tout l'embryon ont une mobilité locale importante et sont particulièrement présents au niveau des sites d'apoptose où ils phagocytent les corps apoptotiques.

Le second lignage cellulaire généré par les prohémocytes correspond aux cellules à cristaux qui représentent environ 5% des hémocytes embryonnaires (environ 30 cellules). Ces cellules sont détectées à des stades tardifs de l'embryogenèse et contrairement aux plasmatoctes, les cellules à cristaux migrent peu et restent localisées en deux clusters bilatéraux au niveau du proventricule (Lebestky et al., 2000).

2. L'hématopoïèse larvaire

La deuxième vague d'hématopoïèse a lieu durant les stades larvaires à partir d'un organe d'origine mésodermique : la glande lymphatique. Cet organe, délimité par une lame basale, correspond à un organe bilatéral multilobé, situé dorsalement. Trois types cellulaires peuvent être générés au cours de cette seconde vague d'hématopoïèse : des plasmacytes, des cellules à cristaux et des lamellocytes (Lanot et al., 2001).

2.1 Origine de la glande lymphatique

Par des expériences de transplantation cellulaire homotopiques au stade blastoderme, Holtz et al. ont mis en évidence que les précurseurs de la glande sont issus du mésoderme latéral embryonnaire. Des expériences complémentaires de transplantation hétérotopiques ont permis de montrer que, contrairement aux prohémyocytes embryonnaires, les précurseurs de la glande ne sont pas encore spécifiés au stade blastoderme (Holz et al., 2003). Les précurseurs de la glande lymphatique peuvent être visualisés par l'expression du marqueur spécifique Collier à partir du stade 11 de l'embryogenèse, lors de l'extension de la bandelette germinative (Crozatier et al., 2004). A ce stade, les précurseurs de la glande correspondent à deux clusters de cellules dans le mésoderme dorsal des segments thoraciques T2 et T3. Ces clusters prolifèrent et coalescent au cours de la rétraction de la bandelette et, de manière simultanée, ces cellules migrent dorsalement pour préfigurer la première paire de lobes de la glande lymphatique. En fin d'embryogenèse, les primordia de la glande lymphatique se résument à deux lobes bilatéraux localisés le long du vaisseau dorsal, composé chacun d'une vingtaine de cellules correspondant à des prohémyocytes indifférenciés. Au second stade larvaire, les prohémyocytes prolifèrent activement, les lobes antérieurs augmentent de taille et des lobes secondaires vont se former postérieurement. La glande lymphatique se compose, en fin de stade L3, de 3 à 6 paires de lobes situés le long du vaisseau dorsal (aorte) (Crozatier et al., 2004).

Les études menées sur l'origine de la glande lymphatique ont agrémenté le débat concernant l'existence d'un hémangioblaste. Chez les vertébrés, l'hématopoïèse et la vasculogenèse sont deux processus interdépendants : d'une part, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les angioblastes sont générés à des positions anatomiques proches

et d'autre part, ces précurseurs expriment un certain nombre de gènes similaires. Ces données ont soulevé l'hypothèse de l'existence d'un hémangioblaste : une cellule capable de générer à la fois des cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales (pour revues (Bollerot et al., 2005; Nishikawa, 2001)). Cependant, chez les vertébrés, l'existence d'un hémangioblaste est controversée. Par exemple, lors de la vague d'hématopoïèse primitive dans le sac vitellin, les cellules hématopoïétiques (HC) et les cellules endothéliales (EC) apparaissent en même temps à partir d'un même territoire mésodermique et, chez la souris, des analyses de lignages ont permis de mettre en évidence l'existence d'un précurseur mésodermique commun ayant le potentiel de générer une population mixte EC et HC (Huber et al., 2004). D'autre part, dans la région AGM, l'aorte est formée un jour avant l'apparition des cellules hématopoïétiques. Chez le poulet et chez la souris, des expériences de lignage ont mis en évidence que le plancher de l'aorte génère de manière transitoire des groupes de cellules qui expriment des marqueurs hématopoïétiques spécifiques des HSC. De plus, chez la souris, ces cellules issues du plancher de l'aorte, isolées et mises en culture ont une capacité hémogénique. Ces données, bien qu'elles ne soient pas suffisantes pour démontrer l'existence d'un précurseur commun de type hémangioblaste, ont permis de proposer que le plancher de l'aorte correspond à un endothélium hémogénique, c'est-à-dire capable de générer des cellules HSC (Bollerot et al., 2005).

Chez la Drosophile, à la fin de l'embryogenèse, la glande lymphatique se trouve en association étroite avec l'aorte dorsale, qui correspond à un tube contractile formé par un épithélium de cellules appelées cardioblastes. En fait, la région antérieure de l'aorte dorsale qui est en association étroite avec la glande lymphatique n'a pas d'activité contractile et est assimilée à un endothélium. Récemment, une étude de lignage a mis en évidence qu'une cellule de la glande lymphatique et un cardioblaste pouvaient provenir d'une même cellule (Mandal et al., 2004). Ces données mettent en évidence *in vivo* l'existence d'une origine commune de ces deux types cellulaires. Bien que l'hémangioblaste lui-même ne soit actuellement pas identifié, ces résultats suggèrent l'existence d'un précurseur mésodermique commun capable de générer ces cellules hématopoïétiques et vasculaires.

2.2 L'hématopoïèse dans la glande lymphatique

Au stade larvaire L3, la glande lymphatique correspond à un organe bilatéral multilobé, situé dans la région dorsale de la larve en association avec le vaisseau dorsal.

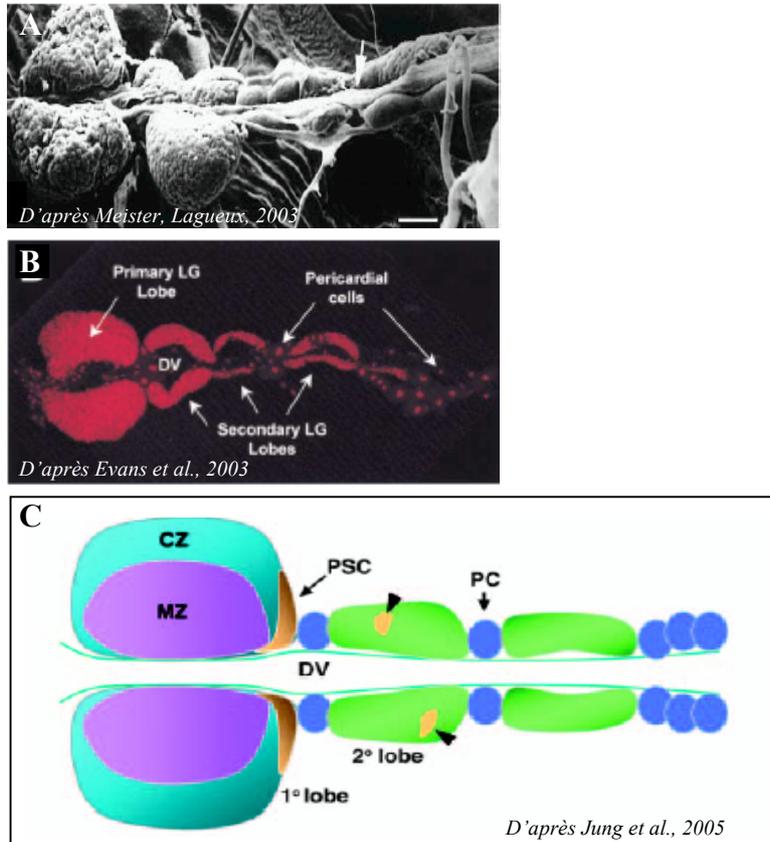


Figure 12 : Structure de la glande lymphatique.(A) Glande lymphatique de larve de troisième stade observée par microscopie électronique à balayage. La glande est composée de 3 à 6 paires de lobes situés le long du vaisseau dorsal (flèche). Antérieur à gauche. (B) Visualisation de la glande lymphatique (LG) par marquage ToPro3. La glande est organisée en lobes primaires et secondaires. Les lobes sont séparés par des cellules pericardiales. (C) Représentation schématique de la glande lymphatique au stade L3. CZ : zone corticale, MZ : zone médullaire, PSC : centre signalisateur postérieur, DV : vaisseau dorsal, PC : cellule péricardique. Voir le texte pour les détails.

Chaque lobe est séparé du suivant par une cellule appelée cellule péricardiaque ou néphrocyte (Figure 12). On distingue les lobes primaires (antérieurs) et les lobes secondaires situés postérieurement. Les hémocytes sont localisés de manière très organisée dans le lobe primaire de la glande lymphatique et trois zones ont été décrites : une zone médullaire, une zone corticale, un Post Signaling Center (PSC) (Jung et al., 2005). La zone médullaire, située centralement, a un aspect dense et correspond à une population d'hémocytes indifférenciés qui ont une activité proliférative réduite. La zone corticale, située latéralement, correspond à une zone d'apparence granulaire et contient des hémocytes en voie de différenciation. Les cellules de cette zone ont une activité proliférative intense. La troisième zone, le PSC est caractérisée par l'expression de marqueurs spécifiques et est constituée de cellules qui ne prolifèrent plus au stade L3 (Lebestky et al., 2003). Les lobes secondaires sont constitués de cellules indifférenciées (Jung et al., 2005). Des expériences de lignage suggèrent que les hémocytes localisés dans la zone corticale proviennent de la zone médullaire (Jung et al., 2005) qui, au stade L3, est considérée comme un réservoir de prohémocytes quiescents. En condition de non-infection, la glande lymphatique libère les hémocytes dans la circulation seulement lors de la métamorphose (Holz et al., 2003). Cette étape est sous le contrôle de l'hormone stéroïde ecdysone (Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002) qui orchestre toutes les modifications tissulaires à la métamorphose.

En condition normale, la glande lymphatique ne génère que des plasmatoctes et des cellules à cristaux : dans la zone corticale se trouvent des hémocytes en voie de différenciation ou des hémocytes matures qui correspondent de manière majoritaire à des plasmatoctes et en moindre proportion à des cellules à cristaux (<5% de la population).

En plus de ces deux populations d'hémocytes différenciés, la glande lymphatique est capable de générer un troisième type cellulaire : les lamellocytes. Ce type cellulaire n'est pas présent en condition normale, mais en réponse à un parasitisme par la guêpe *Leptopilina boulardi*, la glande lymphatique va alors proliférer de manière drastique et produire ce type cellulaire spécialisé dans l'encapsulation des gros parasites. Les lamellocytes sont libérés dans la circulation 48 h après l'infection. (Lanot et al., 2001).

Les relations de lignage entre les trois types cellulaires produits par la glande lymphatique, ainsi que les relations entre les trois zones ne sont encore que très partiellement déterminées et de nombreuses questions sont encore en suspens. Quelles sont les relations de hiérarchie cellulaire au cours de l'hématopoïèse larvaire ? Existe-t-il un précurseur commun aux trois populations sanguines ou seulement à deux des populations ? Les plasmatoctes sont



D'après Goto et al., 2003

Figure 13 : Répartition des hémocytes au stade larvaire. Larve L3 *hml-Gal4 ; uas-GFP*. Antérieur à gauche, dorsal en haut. Les hémocytes circulants sont répartis dans l'ensemble de la larve, les cellules sessiles sont localisées au niveau de chaque segment (tête de flèche). La glande lymphatique est aussi visible (flèche).

caractérisés par leur activité de phagocytose et les lamellocytes sont dépourvus d'une telle activité, ce qui suggère que les lamellocytes ne sont pas des plasmatocytes à un stade ultérieur de différenciation. D'autre part, des données suggèrent que les lamellocytes expriment des phénoloxydases, enzymes spécifiques des cellules à cristaux impliquées dans la réaction de mélanisation. Quelle est la relation de lignage entre les cellules à cristaux et les lamellocytes ? De plus, quelle est la relation entre la zone médullaire et la production des types cellulaires, notamment les lamellocytes ? Des expériences de lignage permettront de mieux définir les relations entre les types cellulaires.

3. Double origine des hémocytes au stade larvaire

Aux stades larvaires, L1, L2 et L3, outre les hémocytes présents dans la glande lymphatique, on trouve un grand nombre de cellules sanguines en circulation ainsi que des hémocytes attachés à l'épiderme appelés cellules sessiles (Figure 13). Parmi les cellules circulantes comme parmi les cellules sessiles, on trouve des plasmatocytes et des cellules à cristaux et ces hémocytes sont capables de proliférer (Lanot et al., 2001). En 2003, Holz et al. ont réalisé des expériences de traçage par transplantation homotopique au stade blastoderme de cellules provenant d'embryons GFP⁺ vers un embryon GFP⁻. Ces expériences de lignage ont permis de mettre en évidence que les hémocytes embryonnaires perdurent aux stades larvaires et sont retrouvés en circulation au stade larvaire L3. De manière similaire, les auteurs ont montré que les cellules issues du mésoderme latéral qui sont retrouvées dans la glande lymphatique, ne passent pas dans la circulation avant la fin de la vie larvaire. Ces données suggèrent que la totalité des hémocytes circulants de la larve correspondent aux hémocytes d'origine embryonnaire qui perdurent au stade larvaire et constituent les hémocytes circulants et les cellules sessiles de la larve (Holz et al., 2003).

Sorrentino et al. ont mis en évidence que, suite à un parasitisme par *L. boulardi*, on observe dans la circulation une augmentation drastique du nombre de cellules à cristaux et l'apparition de lamellocytes (Sorrentino et al., 2002). De plus, les auteurs ont montré que les hémocytes en circulation ne prolifèrent que très peu alors que la glande prolifère massivement puis éclate. Cette étape est corrélée avec l'augmentation du nombre de cellules en circulation. Ces données suggèrent donc que les lamellocytes et les cellules à cristaux surnuméraires qui sont produits en condition de parasitisme proviennent exclusivement de la glande lymphatique et non des cellules circulantes d'origines embryonnaires.

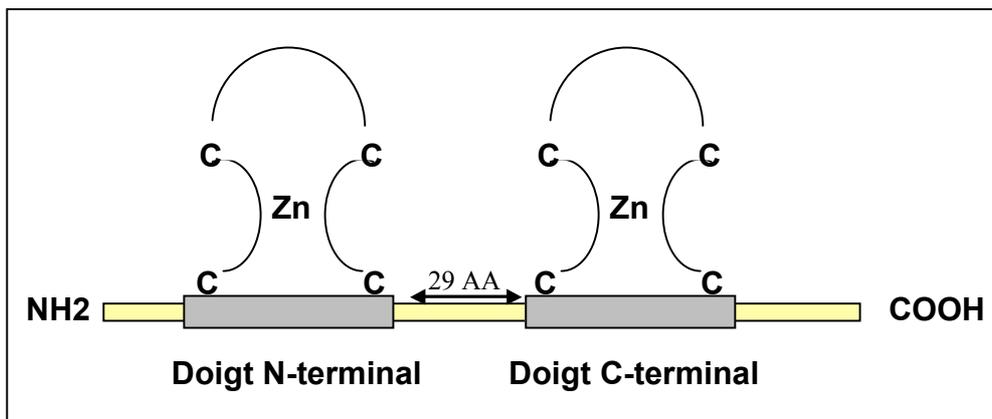


Figure 14 : Structure des facteurs de transcriptions GATA.

Au stade adulte, on retrouve à la fois des hémocytes d'origine embryonnaire et des hémocytes issus de la glande lymphatique et aucun organe hématopoïétique adulte n'a été identifié.

B. La régulation génique de l'hématopoïèse

Les études qui ont été réalisées sur les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse chez la *Drosophile* ont permis de mettre en évidence le rôle de certains facteurs de transcription et des voies de signalisation dans le contrôle de ce processus au stade embryonnaire ou au stade larvaire. De plus, la plupart des facteurs qui participent au contrôle de l'hématopoïèse sont conservées au cours de l'évolution, de la *Drosophile* aux vertébrés (Evans et al., 2003; Fossett and Schulz, 2001). Je présenterais dans cette partie les mécanismes impliqués dans l'induction des différents destins cellulaires, plasmacytes, cellules à cristaux et lamellocytes.

1. Régulation de l'hématopoïèse embryonnaire

1.1 Le facteur de transcription de type GATA, Serpent

Les facteurs de transcription de type GATA correspondent à une famille structurellement très conservée de protéines à doigt de zinc (pour revue (Lowry and Mackay, 2006; Morceau et al., 2004)). Chez les vertébrés, les facteurs GATA contiennent deux motifs à doigt de zinc de type Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys, séparés par 29 acides aminés. Ces deux doigts de zinc sont référencés comme doigt N-terminal et doigt C-terminal (Figure 14). Le doigt C-terminal est impliqué dans la liaison à l'ADN au niveau de séquences consensus (A/T)GATA(A/G) (Martin and Orkin, 1990; Merika and Orkin, 1993) mais permet aussi l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (Cantor and Orkin, 2002). Le second doigt de zinc, N-terminal, est impliqué dans la modulation de la liaison à l'ADN au niveau de sites GATA particuliers (Trainor et al., 2000; Trainor et al., 1996) et est spécifiquement impliqué dans le recrutement de corégulateurs transcriptionnels de type FOG (Friend Of GATA)

(Crispino et al., 1999; Tsang et al., 1998; Tsang et al., 1997). Il est à noter que chez la *Drosophile*, comme chez de nombreux invertébrés, le doigt de zinc N-terminal n'est pas présent dans tous les facteurs GATA. Ce dernier point sera développé par la suite.

Les facteurs de transcription GATA interviennent dans de nombreux processus développementaux. Chez les vertébrés, les facteurs GATA-1, -2 et -3 sont impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse (Orkin et al., 1998), alors que les facteurs GATA-4, -5 et -6 sont impliqués dans la différenciation de divers organes d'origine endodermique, tels que l'intestin et le foie (revue (Molkentin, 2000)). Au cours de l'hématopoïèse, les facteurs GATA-1, -2 et -3 interviennent à de multiples étapes de ce processus. Chez la souris, GATA-2 contrôle la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques, alors que GATA-1 et GATA-3 interviennent respectivement lors de la différenciation des érythrocytes, des mégacaryocytes et des éosinophiles et lors de la différenciation des lymphocytes T.

Chez la *Drosophile*, cinq facteurs GATA ont été identifiés, Panier (Pnr), Serpent (Srp), Grain (Grn), dGATAd et dGATAe. Mais, alors que chez les vertébrés, plusieurs facteurs GATA interviennent dans la régulation de l'hématopoïèse, chez la *Drosophile*, seul le facteur GATA Srp participe au contrôle de ce processus au stade embryonnaire.

Au cours du développement embryonnaire, *srp* est exprimé dans différents territoires endodermiques et mésodermiques et notamment dans le territoire hématopoïétique (Rehorn et al., 1996). Au stade blastoderme (stade 5), l'expression de *srp* dans le mésoderme antérieur définit la population de précurseurs hématopoïétiques, les prohémoctes. Puis, son expression est maintenue dans les hémocytes, lors de leur différenciation en plasmatoctes ou en cellules à cristaux. En condition de perte de fonction pour *srp*, des prohémoctes apparaissent en nombre restreint puis disparaissent rapidement et il n'y a ni formation de plasmatoctes, ni formation de cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996). Srp est donc requis précocement pour spécifier et maintenir la population de prohémoctes. Cependant, étant donné que son expression est maintenue lors de la différenciation des hémocytes, il est envisageable que Srp intervienne plus tardivement, par exemple, lors de la différenciation des plasmatoctes et/ou des cellules à cristaux.

L'absence d'hématopoïèse en contexte mutant pour *srp*, met en évidence le rôle majeur de ce facteur au cours de ce processus. De plus, Srp est nécessaire à l'expression de trois gènes exprimés au cours de l'hématopoïèse embryonnaire : *glial cell missing (gcm)*

(Bernardoni et al., 1997), *lozenge (lz)* (Lebestky et al., 2000) et *u-shaped (ush)* (Fossett et al., 2001). Ces trois gènes participent à la formation des deux lignages hématopoïétiques embryonnaires, plasmacytes et cellules à cristaux.

1.2 Les facteurs de transcription Glial Cell Missing (Gcm) et Gcm2

Le facteur de transcription Glial Cell Missing (Gcm) a été initialement caractérisé pour sa fonction dans la différenciation des cellules gliales lors du développement du système nerveux où il joue le rôle de switch génétique entre un destin glial et neural (Jones et al., 1995; Van De Bor and Giangrande, 2002). Plus récemment, *gcm2* a été isolé sur la base de sa conservation de séquence avec *gcm* (Alfonso and Jones, 2002; Kammerer and Giangrande, 2001). Outre leur rôle dans la gliogenèse, *gcm* et *gcm2* interviennent dans la formation des plasmacytes au stade embryonnaire.

L'expression de *gcm* est détectée très précocément dans les précurseurs des plasmacytes et son expression est maintenue spécifiquement dans cette population jusqu'au stade 11 (Bernardoni et al., 1997). *gcm2* est aussi exprimé dans les plasmacytes dès les stades précoces mais à un niveau plus faible que *gcm*. Il a été montré que *gcm* et *gcm2* ont des fonctions redondantes dans la formation des plasmacytes. L'absence simultanée de *gcm* et *gcm2* ne conduit pas à l'absence totale de formation des plasmacytes mais à une réduction de 60% de leur nombre. Cependant, les plasmacytes résiduels ne se différencient pas en macrophages matures, notamment ils n'expriment pas Crq et ont une morphologie aberrante. Il est à noter que dans ce contexte mutant pour *gcm* et *gcm2*, la formation des cellules à cristaux n'est pas affectée (Alfonso and Jones, 2002). Bien que ces résultats suggèrent que *gcm/gcm2* ne soient pas strictement requis pour la formation de ce lignage, l'expression ectopique de *gcm* (*hs-gcm*) est suffisante pour induire une augmentation du nombre de plasmacytes (Bernardoni et al., 1997) et l'expression ectopique de *gcm* dans les précurseurs des cellules à cristaux induit leur différenciation en plasmacytes matures (Lebestky et al., 2000). Ces données montrent que Gcm et Gcm2 participent à la formation des plasmacytes et sont requis pour leur différenciation en macrophages (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997).

À ce jour, chez les vertébrés, aucun rôle n'a été décrit pour GcmA et GcmB (orthologues de Gcm et Gcm2) au cours de l'hématopoïèse. Toutefois, récemment, l'expression de *gcmB* a été détectée dans les macrophages primitifs chez le poisson zèbre (Hanaoka et al., 2004).

1.3 Le facteur de transcription de type Runx, Lozeng

Chez les mammifères, Runx1 est requis très tôt au cours de l'embryogenèse pour spécifier les précurseurs HSC. Plus tardivement, Runx1 intervient aussi lors du développement des mégacaryocytes et des lymphocytes (Ichikawa et al., 2004). Les facteurs de transcription de type RUNX sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN spécifique, le domaine Runt. Chez la Drosophile, le facteur RUNX Lozeng (Lz), initialement identifié pour sa fonction lors du développement de l'œil, présente une grande identité de séquence avec Runx1 (71% d'homologie au niveau du domaine Runt).

Au cours de l'hématopoïèse embryonnaire, l'expression de *lz* définit une sous-population de cellules correspondant aux précurseurs des cellules à cristaux. L'expression de *lz* est détectée à partir du stade 10 au niveau de deux groupes d'hémocytes *Srp*⁺ localisés dans la région antérieure de l'embryon. Puis, en fin d'embryogenèse, ces deux clusters de cellules qui maintiennent l'expression de Lz (environ 30 cellules situées au niveau du proventricule) se différencient en cellules à cristaux, c'est à dire acquièrent les caractéristiques morphologiques spécifiques de ce lignage et expriment notamment le marqueur de différenciation *Bc*. L'expression de *lz* est nécessaire pour induire spécifiquement la formation de ce lignage. En condition de perte de fonction pour *lz* aucune cellule à cristaux n'est formée, mais la différenciation des plasmacytes n'est pas affectée (Lebestky et al., 2000).

Les expressions des facteurs de transcription Lz et Gcm/Gcm2 sont mutuellement exclusives. Lz et Gcm/Gcm2 sont décrits comme des facteurs lignage spécifiques respectivement impliqués dans le contrôle de la différenciation des cellules à cristaux et des plasmacytes.

1.4 Le cofacteur transcriptionnel de type FOG, U-Shaped

Le gène *u-shaped* code pour un facteur de type FOG. Au stade embryonnaire *ush* est exprimé selon un patron complexe et dynamique (Fossett et al., 2001; Fossett et al., 2000). Notamment ce gène est exprimé dans les hémocytes à partir du stade 8 puis son expression est spécifiquement maintenue dans les plasmatoctes. Au stade 10, stade auquel *lz* commence à être exprimé, il semble que certains précurseurs *Lz+* coexpriment *Ush*. Puis le nombre de cellules *Lz+* qui expriment *Ush* diminue et en fin d'embryogenèse, *Ush* est exclu des cellules à cristaux. La perte de fonction de *ush* conduit à une augmentation d'environ 30% de la population de cellules à cristaux alors que la surexpression de *ush* dans les précurseurs de ce lignage conduit à une réduction du nombre de cellules à cristaux matures (Fossett et al., 2000). L'ensemble de ces résultats indique que ce facteur est un répresseur du destin cellule à cristaux. Aucun rôle de *Ush* lors de la différenciation des plasmatoctes n'a été identifié.

FOG-1 qui est le membre fondateur de la famille FOG (Friend Of GATA), a été identifié par Tsang et al. en 1997 lors d'un crible double hybride d'interacteurs spécifiques du doigt N-terminal des GATA (Tsang et al., 1997). Chez les mammifères deux protéines à multiples doigts de zinc de la famille FOG ont été identifiées (FOG-1 et FOG-2). De nombreuses données de la littérature montrent que les facteurs FOG sont des cofacteurs des GATA et que ces protéines sont spécifiquement recrutées par le doigt de zinc N-terminal des GATA. Comme décrit précédemment, chez les vertébrés, GATA-1, -2 et -3 participent à la régulation de différents aspects de l'hématopoïèse. Au cours de ce processus, ces facteurs GATA sont connus pour interagir avec des protéines de la famille FOG (pour revue (Cantor and Orkin, 2001)). Par exemple, chez la souris, GATA-1 induit la différenciation des éosinophiles, alors que sous forme complexée avec FOG-1, il réprime la formation de ce lignage (Querfurth et al., 2000). A l'inverse, la formation du complexe GATA-1/FOG-1 est nécessaire pour permettre la différenciation érythroïdique (Tsang et al., 1998; Tsang et al., 1997). Au niveau moléculaire, le complexe GATA-1/FOG-1 agit soit comme activateur (Gaines et al., 2000), soit comme répresseur transcriptionnel (Fox et al., 1999). De plus, de nombreuses données montrent que l'activité des facteurs FOG passe toujours par la formation d'un complexe avec un facteur de transcription GATA (Chang et al., 2002).

Chez la *Drosophile*, *Ush* est le seul facteur FOG identifié (Cubadda et al., 1997). Il a été montré que *Ush* forme un complexe avec le facteur GATA Pannier (*Pnr*), au cours de la formation des soies thoraciques adultes (Haenlin et al., 1997) et lors de la formation de l'œil

(Fossett et al., 2001). Le facteur Pnr est l'un des cinq facteurs GATA codé par le génome de la *Drosophile*. Contrairement aux vertébrés, chez la *Drosophile*, les facteurs GATA ne possèdent pas tous un doigt de zinc N-terminal. Pnr possède les deux doigts de zinc C-terminal et N-terminal et il a été montré que, comme chez les vertébrés, Ush interagit avec Pnr *via* le doigt de zinc N-terminal du facteur GATA (Cubadda et al., 1997).

Lorsque j'ai débuté ma thèse, Srp était décrit comme un facteur GATA ne possédant que le doigt de zinc de type C-terminal (Lowry and Atchley, 2000; Rehorn et al., 1996) et donc incapable d'interagir avec Ush au cours de l'hématopoïèse. Une question élémentaire se posait alors : Comment Ush agit-il au cours de l'hématopoïèse ? Ush fonctionne t'il seul, de manière indépendante des GATA ou existe t'il un facteur GATA à deux doigts de zinc capable d'interagir avec Ush au cours de ce processus ?

2. Régulation de l'hématopoïèse larvaire

Comme décrit précédemment, la glande lymphatique correspond à une structure complexe : (i) les lobes antérieurs sont organisés en différentes zones, corticales, médullaire et PSC ; (ii) cet organe est capable de générer constitutivement des plasmacytes et des cellules à cristaux mais est aussi capable de répondre à une signalisation pour induire la formation des lamellocytes en condition de challenge immun. De nombreuses études ont été réalisées aux stades larvaires. Cependant, dans la littérature, il existe une confusion importante entre les hémocytes en circulation qui sont d'origine embryonnaire et les hémocytes produits par la glande lymphatique. Ainsi, avant la parution des travaux de Holz et al. qui montrent que la glande lymphatique ne libère les hémocytes dans la circulation qu'à la fin de la vie larvaire (Holz et al., 2003), il était couramment admis que les hémocytes en circulation reflétaient l'hématopoïèse dans la glande, ce qui s'avère être inexact. De plus, de nombreux contextes mutants, notamment des voies de signalisation Ras, JAK/STAT et Toll, induisent non seulement un phénotype au niveau de la glande lymphatique mais aussi au niveau des cellules circulantes (Asha et al., 2003; Luo et al., 1995; Luo et al., 2002; Qiu et al., 1998; Sorrentino et al., 2004). En conséquence, il est difficile de savoir si ces voies de signalisation sont impliquées spécifiquement dans le contrôle de l'hématopoïèse dans la glande lymphatique ou si elles jouent un rôle plus général notamment dans la prolifération des hémocytes.

Dans ce chapitre, je présenterais certaines données qui concernent les mécanismes de régulation de l'acquisition d'un destin plasmatocte, cellule à cristaux ou lamellocyte dans la glande lymphatique.

2.1 Les facteurs *Srp* et *Ush* au cours de l'hématopoïèse larvaire

En fin d'embryogenèse, *srp* est exprimé dans les précurseurs de la glande lymphatique. Puis, au stade larvaire, *srp* reste exprimé dans l'ensemble de la glande. Au stade L3, son expression est détectée dans la zone médullaire ainsi que dans la zone corticale. Comme au stade embryonnaire, *Srp* est exprimé dans les prohémostocytes et dans les cellules sanguines différenciées (Jung et al., 2005; Lebestky et al., 2000). Plusieurs études indiquent que *srp* a une fonction précoce lors de la formation de la glande lymphatique. En fin d'embryogenèse, les cellules de la glande lymphatique visualisées par l'expression du marqueur *Odd* forment deux clusters qui flanquent l'aorte. Dans un mutant *srp*, comme dans un contexte sauvage, les clusters *Odd*⁺ sont formés, cependant, ces cellules expriment en plus la *Pericardine* (*Prc*) qui est un marqueur spécifique des cellules péricardiaques. Ceci suggère qu'en absence de *srp* certains aspects de l'identité prohémostocytes sont perdus au profit d'une identité péricardiaque (Mandal et al., 2004). Réciproquement, plusieurs données suggèrent que la surexpression de *srp* dans le mésoderme cardiogénique induit la transformation des cellules péricardiaques en cellules de type hématopoïétique (Han and Olson, 2005; Mandal et al., 2004). Ces données montrent que *srp* est requis pour spécifier précocement l'identité des cellules hématopoïétiques. Le rôle éventuel de *srp* au cours de la formation des hémostocytes larvaires n'est pas connu.

Au stade larvaire, *ush* est aussi exprimé dans les lobes primaires et secondaires de la glande lymphatique selon un patron hétérogène (Fossett et al., 2001). Actuellement, il n'y a aucune donnée sur le rôle de *Ush* au cours de cette seconde vague d'hématopoïèse, mais par analogie avec l'hématopoïèse embryonnaire, il est proposé que *Ush* réprime la différenciation des cellules à cristaux.

2.2 Rôles du facteur Gcm et du récepteur PVR dans la formation des plasmacytes

Très peu de données traitent du rôle de *gcm* au cours de l'hématopoïèse larvaire. Lebestky et al. ont montré que la surexpression de Gcm au stade larvaire dans les cellules Lz⁺ circulantes induit leur transformation en plasmacytes (Lebestky et al., 2000). Ainsi, par analogie avec les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse embryonnaire, on considère que *gcm* est impliqué dans la formation des plasmacytes dans la glande lymphatique.

Le récepteur PVR est l'homologue unique des récepteurs PDGFR et VEGFR des vertébrés. Des données récentes suggèrent que PVR est impliqué dans la différenciation des plasmacytes lors de l'hématopoïèse larvaire (Jung et al., 2005). En effet, l'analyse des clones mutants pour *pvr* dans la glande lymphatique a montré que les cellules *pvr*^{-/-} ont la capacité de se différencier en cellules à cristaux mais pas en plasmacytes. Il est à noter que la survie cellulaire n'est pas affectée dans ces clones mutants pour *pvr*. De manière surprenante, le rôle de PVR au cours de l'hématopoïèse larvaire, diffère donc de son rôle au cours de l'hématopoïèse embryonnaire où PVR est impliqué dans la survie et la migration des plasmacytes (Bruckner et al., 2004; Cho et al., 2002).

2.3 Rôle de Lz au cours de l'hématopoïèse larvaire

Au stade larvaire, *lz* est exprimé dans une sous-population de cellules de la glande lymphatique à partir du stade L2. Au stade L3 le nombre de cellules Lz⁺ va augmenter pour atteindre 50 à 100 cellules par lobe primaire. Ces cellules, qui correspondent à une sous-population d'hémocytes Srp⁺ en voie de différenciation, sont localisées dans la zone corticale comme les cellules à cristaux matures (Jung et al., 2005; Lebestky et al., 2000). Comme au stade embryonnaire, l'expression de *lz* est nécessaire à la formation des cellules à cristaux dans la glande (Karène BOYER, communication personnelle).

2.4 Le facteur de transcription Collier

Le gène *collier* (*col*) code pour un facteur de transcription orthologue de EBF (Early B-cell Factor) des mammifères. L'expression de *col* est détectée dès le stade embryonnaire (stade 13) au niveau des clusters de cellules à l'origine du lobe primaire de la glande lymphatique. Au stade L3, son expression est maintenue spécifiquement dans la région postérieure du lobe primaire dans les 30 à 40 cellules qui correspondent au PSC. L'expression de *col* dans ce territoire est requise pour définir l'identité de ce domaine. En condition perte de fonction de *col*, l'expression des marqueurs spécifiques du PSC (Ser et Ser-lacZ) ne sont plus exprimés (Crozatier et al., 2004).

Il semble que le PSC joue un rôle clé dans la formation des lamellocytes et que l'expression de Col soit nécessaire à la formation de ce lignage. En condition perte de fonction de *col*, aucun lamellocyte ne se différencie en condition d'infection par *L. bouvardi*. Au contraire, la surexpression de *col* dans l'ensemble de la glande (*srp-gal4 ; uas-col*) entraîne une différenciation massive des lamellocytes même en absence d'infection. Les cellules qui expriment Col diffèrent de celles qui se différencient en lamellocytes, ce qui suggère un rôle de Col dans la mise en place d'un signal signalisateur impliqué dans l'induction des lamellocytes (Crozatier et al., 2004).

2.5 La voie de signalisation Notch

Chez les mammifères, on dénombre quatre récepteurs Notch. Des études menées chez la souris ont montré que la signalisation Notch n'est pas indispensable lors de l'hématopoïèse primitive mais joue un rôle essentiel à différents stades de l'hématopoïèse définitive (Radtke et al., 2005). Ainsi, dans l'AGM, précocement, la voie Notch est impliquée dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques, en effet Notch-1 inhibe la différenciation des cellules souches en maintenant l'expression de GATA-2 (Kumano et al., 2001). Plus tardivement, Notch-1 contrôle la spécification des précurseurs lymphoïdes. En effet, de nombreuses études montrent que Notch-1 est requis pour spécifier les précurseurs des lymphocytes T lors du choix binaire entre lymphocytes T *versus* B (Harper et al., 2003; Izon et al., 2002; Vercauteren and Sutherland, 2004), pour revue (Bartholdy and Matthias, 2004; Busslinger et al., 2000).

Dans la glande lymphatique, chez la Drosophile, la voie Notch est impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse. Serrate (Ser) a été caractérisé comme étant le ligand de Notch lors de l'hématopoïèse larvaire (Duvic et al., 2002). Au stade L3, l'expression de Ser est détectée dans la zone postérieure des lobes primaires au niveau du PSC (Lebestky et al., 2003). L'analyse des clones pertes de fonction de Notch suggère que Notch joue un rôle précoce dans la prolifération des cellules hématopoïétiques. Il est donc envisageable que le PSC joue un rôle majeur non seulement dans l'induction des lamellocytes mais aussi dans le contrôle de la prolifération des cellules de la glande lymphatique.

De plus, un rôle tardif de Notch dans la formation des cellules à cristaux a été mis en évidence. Plus précisément, les données suggèrent que la voie de signalisation Notch contrôle l'induction de l'expression de *lz* dans la glande lymphatique. D'une part, les cellules Lz+ correspondent aux cellules dans lesquelles la voie Notch a été activée. D'autre part, la perte de fonction de Notch ou de Su(H), qui est l'effecteur de cette voie de signalisation, se traduit par l'absence d'expression de *lz*. Réciproquement, la surexpression d'une forme constitutivement active de Notch induit une forte augmentation du nombre de cellules Lz+ (Lebestky et al., 2003). Dans la glande lymphatique, au stade L3, en plus des cellules Ser+ qui constituent le PSC, on observe des cellules Ser+ dispersées dans le lobe antérieur et situées au voisinage des cellules Lz+. Ces cellules Ser+ sont supposées correspondre aux cellules signalisatrices qui induisent la voie Notch et donc *lz* dans les cellules adjacentes (Lebestky et al., 2003). Les cellules Ser+ dispersées et le PSC semblent correspondre à deux populations distinctes. En effet, même en absence du PSC, dans un mutant *col*, on détecte encore des cellules Ser+ dispersées dans le lobe antérieur (Crozatier et al., 2004). L'ensemble de ces données montre qu'au stade larvaire, la voie de signalisation Notch est importante pour l'établissement du lignage des cellules à cristaux.

De façon similaire, au stade embryonnaire Lebestky et al. ont proposé que la voie de signalisation Notch soit impliquée dans le développement des cellules à cristaux. En effet, au stade embryonnaire, la perte de fonction zygotique de Notch induit une réduction du nombre de cellules à cristaux. Les auteurs proposent que la présence de cellules à cristaux résiduelles reflète la contribution maternelle de Notch (Lebestky et al., 2003).

2.6 Les voies de signalisation Ras, JAK/STAT et Toll et la formation des lamellocytes

Trois voies de signalisation sont connues pour influencer le nombre d'hémocytes en circulation : les voies Ras, JAK/STAT et Toll (Asha et al., 2003; Luo et al., 1995; Luo et al., 2002; Qiu et al., 1998; Sorrentino et al., 2004). Des mutations qui activent ces voies de signalisation induisent non seulement une augmentation du nombre d'hémocytes totaux en circulation mais induisent aussi la formation de lamellocytes de manière indépendante d'un parasitisme. Les mécanismes qui contrôlent la différenciation des lamellocytes sont encore mal compris et il est possible que ces effets sur la formation des lamellocytes soient indirects. Notamment, il est envisageable que des mutants de ces voies de signalisation affectent d'autres tissus larvaires et conduise à la formation de lamellocytes dans une réaction « auto-immune ». De même, la prolifération aberrante des hémocytes pourrait aussi induire ce type de réponse.

De façon intéressante, Zettervall et al. ont mis en évidence récemment que la prolifération et la production de lamellocytes sont deux phénomènes indépendants (Zettervall et al., 2004). Les auteurs ont réalisé un crible en induisant plusieurs mutants de ces voies de signalisation spécifiquement dans les hémocytes circulants et les hémocytes de la glande. Ainsi, ils ont mis en évidence que l'induction de la voie Ras/MAPK induit une augmentation du nombre d'hémocytes sans induire la formation de lamellocytes. Au contraire, l'activation de la voie JAK/STAT induit la formation de lamellocytes sans induire de manière drastique la prolifération des hémocytes totaux. De plus, d'autres travaux ont mis en évidence que la voie JAK/STAT est impliquée dans la différenciation des lamellocytes dans la glande lymphatique. En effet, l'activation de la voie JAK/STAT dans un contexte mutant gain de fonction pour le récepteur Hopscotch (*hopscotch*^{Tumorous-lethal}) conduit à une augmentation de la prolifération des cellules de la glande lymphatique et à la formation de lamellocytes dans les lobes primaires (Davidson et al., 2005). A l'inverse, même en contexte de parasitisme, les mutants perte de fonction *hopscotch*^{M4} montrent une absence de production de lamellocytes dans la glande (Sorrentino et al., 2004). L'ensemble de ces données met en évidence le rôle essentiel de la voie JAK/STAT dans l'induction de la formation des lamellocytes.

De manière intéressante, il a été montré que les insertions *domeless-Gal4* et *unpaired3-Gal4* sont spécifiquement exprimées dans la zone médullaire du lobe primaire de la glande lymphatique et son expression est perdue dans les hémocytes en différenciation situés dans la zone corticale (Jung et al., 2005). Le gène *domeless* (*dome*) code pour un

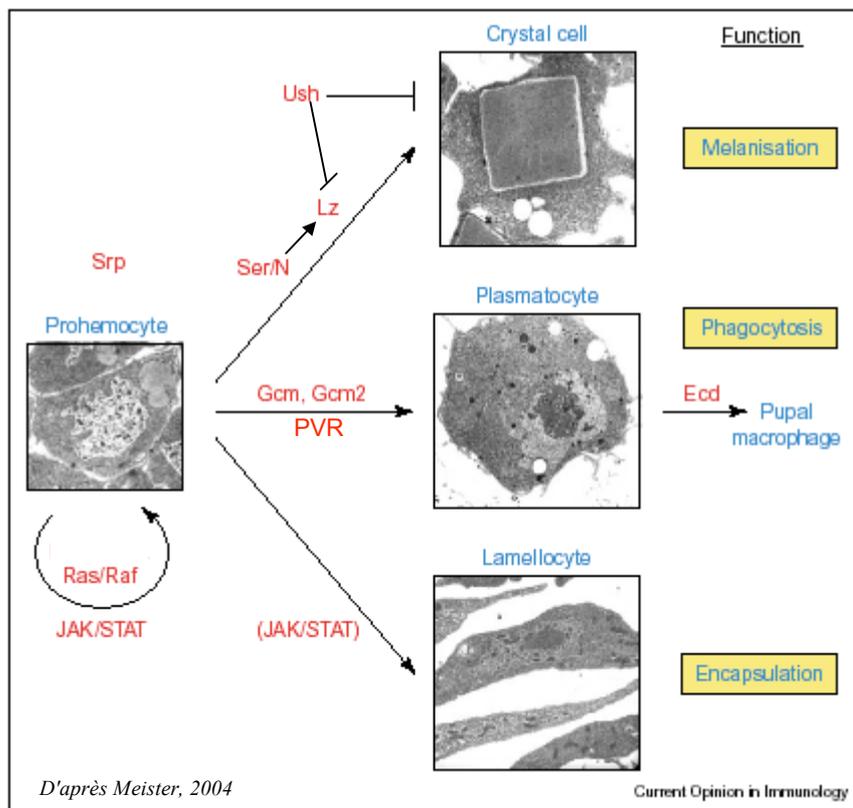


Figure 15 : Régulation de l'hématopoïèse larvaire. (Voir le texte pour les détails).

récepteur impliqué dans l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT, en réponse à la liaison du ligand Unpaired (Brown et al., 2001; Chen et al., 2002). Le rôle du récepteur Dome dans l'hématopoïèse n'est pas connu pour le moment.

Enfin, l'influence de la voie de signalisation Toll sur la formation des lamellocytes est moins claire. L'activation de la voie Toll (*Toll^{l^{0B}}*) induit une hyperprolifération de la glande lymphatique et une production massive de lamellocytes (Davidson et al., 2005; Zettervall et al., 2004), mais, de manière surprenante, les mutants *Toll* ne modifient pas la formation de ce lignage (Sorrentino et al., 2004). Toll est exprimé de manière ubiquitaire dans la glande (Qiu et al., 1998). Par RT-PCR, il a été montré que les plusieurs orthologue de Toll sont aussi exprimés dans la glande lymphatique (*18w*, *toll4*, *toll8*, et *toll9*) (Kambris et al., 2002). La redondance fonctionnelle entre les différents Toll pourrait être responsable de l'absence de phénotypes observés en condition perte de fonction pour *Toll*. Kurucz et al. ont réalisés un crible de protéines exprimées spécifiquement par les différentes classes d'hémocytes (Kurucz et al., 2003). Ce crible a permis d'identifier notamment la Filamine-240 qui est exprimée spécifiquement par les lamellocytes. En condition de perte de fonction de *filamine*, les lamellocytes sont produits même en absence de parasitisme ce qui montre que cette protéine agit comme un suppresseur du développement des lamellocytes. De plus, cette protéine qui contient des domaines de liaison à l'actine a été décrite comme capable d'interagir avec Toll et Tube dans un test double hybride. Ceci suggère donc un rôle de la Filamine dans la signalisation Toll dans le contrôle de la formation des lamellocytes.

De manière intéressante, Au stade embryonnaire, au cours de l'extension de la bandelette germinative, *toll9* est exprimé de manière transitoire au niveau du territoire de formation des hémocytes (Kambris et al., 2002). Cependant, le rôle de la signalisation Toll au cours de l'hématopoïèse embryonnaire n'a pas été exploré.

En conclusion, la glande lymphatique est un organe très complexe et peu de données sont réellement établies concernant les mécanismes qui contrôlent la formation de chaque lignage, plasmatocyte, cellule à cristaux ou lamellocyte dans la glande lymphatique (Figure 15). De nombreuses questions restent ouvertes, notamment : Quelles sont les relations entre les différents domaines de la glande lymphatique ? Quelles sont les relations de lignage entre

les différentes populations hématopoïétiques produites par cet organe hématopoïétique ?
Comment les lamellocytes sont induits en réponse à un parasitisme ?

III. Objectifs de ce travail

Au cours de mon travail de thèse, j'ai abordé deux problématiques étroitement liées, concernant la caractérisation des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse embryonnaire chez la *Drosophile*.

Le premier projet, que je présenterais dans le premier chapitre, concerne l'analyse de la fonction du facteur de transcription GATA *Serpent* au cours de l'hématopoïèse embryonnaire. Nous avons étudié, par des approches *in vitro* et *in vivo*, la régulation de l'activité transcriptionnelle de *Srp* par des cofacteurs et le rôle de ce facteur de transcription à différentes étapes de ce processus, notamment lors des étapes de différenciation des deux populations d'hémocytes embryonnaires, les plasmatoctes et les cellules à cristaux.

Dans le second chapitre, je présenterai les données concernant l'étude de la régulation de l'étape de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires, cellules à cristaux et plasmatoctes. Afin d'aborder cette étape précoce de l'hématopoïèse, nous avons, dans un premier temps, réalisé une analyse descriptive de la ségrégation des deux populations, plasmatoctes et cellules à cristaux. Dans un second temps, nous avons caractérisé le mécanisme de régulation de cette étape qui fait intervenir les deux facteurs « lignages spécifiques » *Gcm* (*Gcm* et *Gcm2*) et *Lz*. L'ensemble de ces travaux nous a permis de mettre en évidence un modèle original du contrôle de la ségrégation de ces deux populations.

Ces deux parties portent sur la régulation de la première vague d'hématopoïèse au stade embryonnaire et reposent respectivement sur une analyse mécanistique de ce processus et sur une analyse développementale.

- RESULTATS -

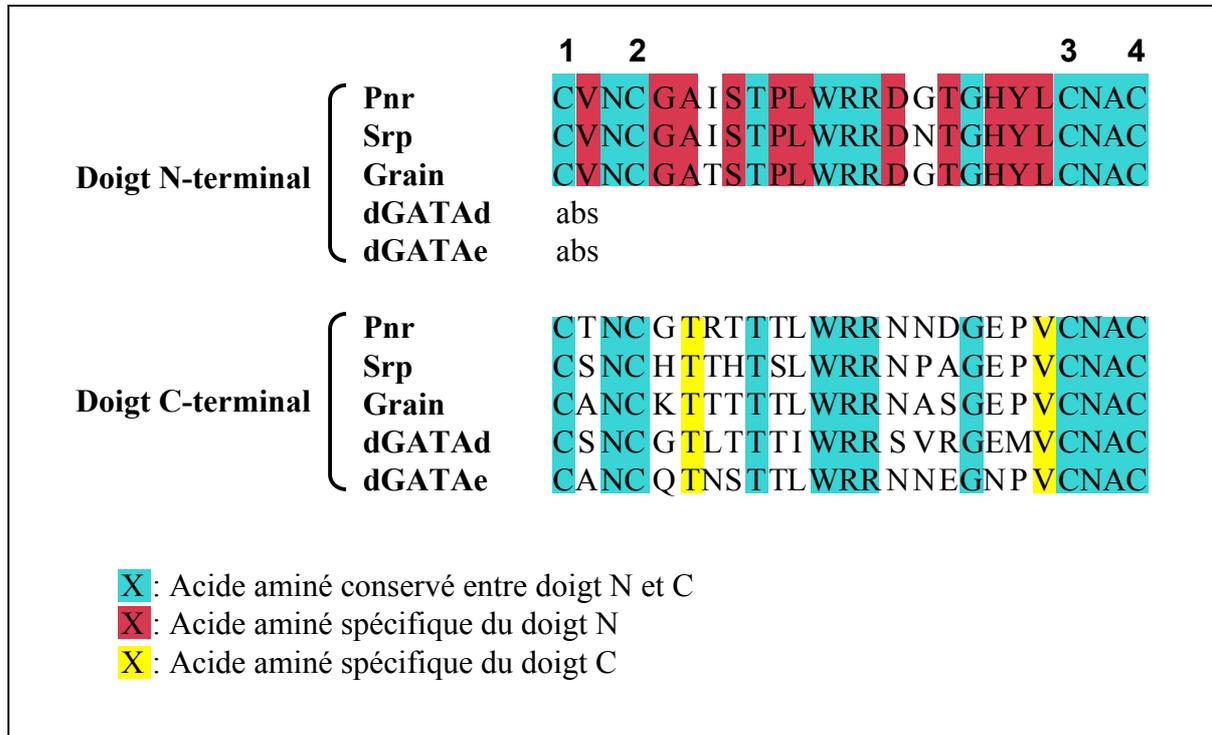


Figure 16 : Alignement des doigts de zinc de type N- et C-terminaux des facteurs GATA de la Drosophile. Noter que les doigts de type N-terminaux sont très conservés, ce qui reflète potentiellement la conservation de fonction due à l'interaction de ce motif avec les facteurs FOG.

CHAPITRE I :

Analyse de la fonction et du mode d'action de Serpent au cours de l'hématopoïèse embryonnaire

I. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des deux isoformes codées par le gène serpent : SrpC et SrpNC.

A. Introduction

Chez la Drosophile, au stade embryonnaire, le gène *srp* qui code pour un facteur de transcription de type GATA est exprimé dans l'ensemble des hémocytes et joue un rôle majeur dans le contrôle de l'hématopoïèse. De manière intéressante, le facteur FOG, Ush, intervient aussi lors de ce processus. Les données de la littérature montrent, d'une part, que l'activité des facteurs FOG passe toujours par la formation d'un complexe avec un facteur de transcription GATA (Chang et al., 2002) et d'autre part, que les facteurs FOG sont recrutés spécifiquement par le doigt de zinc N-terminal de ces facteurs. Quand j'ai débuté mes travaux de thèse, les données sur la structure moléculaire du facteur Srp indiquait que ce facteur GATA ne comportait que le doigt de zinc C-terminal (Rehorn et al., 1996). Srp semblait donc incapable d'interagir avec Ush. Ceci suggérait, soit que Ush avait des fonctions indépendantes des facteurs GATA au cours de l'hématopoïèse, soit que Ush interagissait avec un autre facteur GATA qui comportait un doigt de zinc de type N-terminal.

Au laboratoire, un crible *in silico* a été réalisé afin de rechercher dans le génome de la Drosophile, tous les gènes codants pour des facteurs GATA et permettant de déterminer la présence ou l'absence de séquences codant spécifiquement pour un doigt de type C-terminal ou N-terminal. En effet, bien que les deux doigts de zinc C- et N- terminaux aient un profil de type C-X2-C-X17-C-X2-C, ces motifs présentent des différences significatives dans la séquence d'acides aminés situés entre les cystéines (Figure 16), notamment, les doigts de type

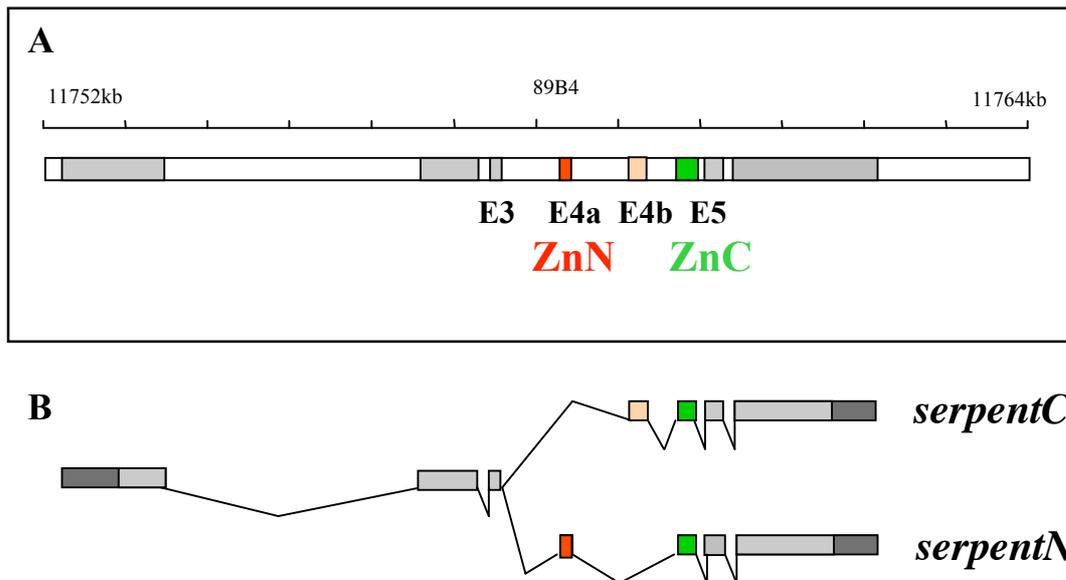


Figure 17 : Structure du gène *serpent*. (A,B) Représentation schématique de la structure du gène *serpent* (*srp*) (A) et des transcrits alternatifs *srpC* et *srpNC* (B).

N-terminaux possèdent une valine conservée entre les deux premières cystéines. Ces deux types de motifs ont donc des signatures spécifiques, permettant de distinguer un doigt de type C-terminal d'un doigt de type N-terminal. Ce crible a permis d'identifier les cinq gènes codant pour les facteurs GATA chez la Drosophile en précisant la présence des doigts de zinc. Ainsi, ce crible a permis de mettre en évidence que deux des cinq facteurs GATA codés par le génome de la Drosophile, dGATAe et dGATAd ne contiennent qu'un seul doigt de zinc de type C-terminal, alors que *pnr* et *grain* (*dDATAc*) codent pour des facteurs à deux doigts de zinc. De manière intéressante, cette étude a révélé l'existence d'un exon codant pour un doigt N-terminal dans le locus du gène *srp* (Figure 17A). Par RT-PCR, nous avons montré que *srp* code pour deux transcrits générés par épissage alternatif, l'un code pour l'isoforme SrpC, déjà décrit, qui ne possède que le doigt de type C-terminal, l'autre code pour un nouvel isoforme, appelé SrpNC, qui possède les deux doigts de zinc C- et N-terminaux (Figure 17B).

De plus, l'analyse du patron d'expression des cinq gènes qui codent pour des facteurs GATA nous a permis de mettre en évidence qu'au stade embryonnaire *srp* est le seul facteur GATA exprimé dans le territoire de formation des hémocytes.

Nous avons donc entrepris de caractériser *in vivo* et *in vitro* l'activité et la fonction de ces isoformes de Srp au cours de l'hématopoïèse embryonnaire.

B. Résultats : résumé

Nous avons montré que *srp* code pour plusieurs isoformes contenant soit seulement le doigt C-terminal (SrpC) soit les deux doigts C- et N-terminaux (SrpNC). Ces deux isoformes sont générées par épissage alternatif et les deux transcrits *srpC* et *srpNC* sont coexprimés au cours de l'embryogenèse, notamment au niveau du domaine hématopoïétique. La présence du doigt N-terminal confère à SrpNC des propriétés biochimiques spécifiques : (i) la présence de ce second doigt stabilise la fixation de Srp à l'ADN au niveau de sites GATA palindromiques ; (ii) le doigt N-terminal permet l'interaction de SrpNC avec le facteur FOG, Ush. Nous avons étudié les activités respectives de SrpC et SrpNC au cours de l'hématopoïèse. Chacune de ces isoformes est suffisante pour restaurer la formation des cellules sanguines, absentes en contexte perte de fonction de *srp*. Nous avons testé la capacité respective de SrpC ou SrpNC à induire de manière ectopique l'expression de différents

marqueurs hématopoïétiques. De manière intéressante, alors que SrpC et SrpNC induisent l'expression de certains gènes de manière similaire (*ush*, *pxn*, *pro-PO*), d'autres gènes sont régulés de manière différentielle par chacune des isoformes. Ainsi, *gcm* est induit de façon ectopique spécifiquement par SrpNC, alors que seul SrpC est capable d'induire l'expression de *crq*. Nos données montrent que l'interaction entre SrpNC et Ush est en partie responsable de ces activités spécifiques de SrpC et SrpNC. Ces résultats suggèrent que la présence ou l'absence du doigt N-terminal des isoformes de Srp peut induire une modulation de l'activité et de la fonction de *srp* au cours du développement.

C. Résultats : publication

Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in Drosophila haematopoiesis.

Lucas WALTZER, Laetitia BATAILLÉ, Sandrine PEYREFITTE and Marc HAENLIN

The EMBO Journal (2002) Vol.21 No 20 pp.5477-5486

Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis

Lucas Waltzer, Laetitia Bataillé,
Sandrine Peyrefitte and Marc Haenlin¹

Centre de Biologie du Développement-CNRS, 31062 Toulouse, France

¹Corresponding author
e-mail: haenlin@cict.fr

serpent (*srp*) encodes a GATA transcription factor essential for haematopoiesis in *Drosophila*. Previously, *Srp* was shown to contain a single GATA zinc finger of C-terminal type. Here we show that *srp* encodes different isoforms, generated by alternative splicing, that contain either only a C-finger (*SrpC*) or both a C- and an N-finger (*SrpNC*). The presence of the N-finger stabilizes the interaction of *Srp* with palindromic GATA sites and allows interaction with the Friend of GATA factor U-shaped (*Ush*). We have examined the respective functions of *SrpC* and *SrpNC* during embryonic haematopoiesis. Both isoforms individually rescue blood cell formation that is lacking in an *srp* null mutation. Interestingly, while *SrpC* and *SrpNC* activate some genes in a similar manner, they regulate others differently. Interaction between *SrpNC* and *Ush* is responsible for some but not all aspects of the distinct activities of *SrpC* and *SrpNC*. Our results suggest that the inclusion or exclusion of the N-finger in the naturally occurring isoforms of *Srp* can provide an effective means of extending the versatility of *srp* function during development.

Keywords: *Drosophila*/FOG/GATA/haematopoiesis/*serpent*

Introduction

Members of the GATA family are zinc finger transcription factors, conserved from yeast to vertebrates, that regulate a variety of developmental processes (Patient and McGhee, 2002). These factors bind to the consensus WGATAR DNA site (Martin and Orkin, 1990; Merika and Orkin, 1993) and contain one or two conserved zinc fingers with the characteristic Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys spacing. In vertebrates, all GATA factors contain two distinctive zinc fingers separated by 29 amino acids and referred to as the N-finger (for N-terminal zinc finger) and C-finger (for C-terminal zinc finger), respectively. However, a number of invertebrate GATA factors, including the *Drosophila* GATA factor Serpent/dGATAb (*Srp*) (Abel *et al.*, 1993; Rehorn *et al.*, 1996), contain only a C-finger (Lowry and Atchley, 2000). The C-finger is responsible for DNA binding (Martin and Orkin, 1990) and for interaction with other transcription factors (Merika and Orkin, 1995; Rekhtman *et al.*, 1999). In vertebrates, the GATA N-finger can modulate the binding of the C-finger to specific GATA sites (Trainor *et al.*, 1996, 2000). Moreover, studies in

mice have revealed a specific requirement for the GATA-1 N-finger for erythroid differentiation (Weiss *et al.*, 1997) and for full rescue of *GATA-1* loss of function (Shimizu *et al.*, 2001). Similarly, specific mutations in the N-finger of the *Drosophila* GATA factor Pannier/dGATAa (*Pnr*) produce dominant effects on the formation of sensory bristles (Romain *et al.*, 1993). Among others, these data suggested that the N-finger could act as a binding domain for a cofactor regulating GATA activity. Most notably, it was shown in vertebrates and in flies that GATA N-finger mediates the interaction with transcriptional coregulators of the Friend of GATA (FOG)/U-shaped (*Ush*) family (Haenlin *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 1997).

FOG genes, described in mammals, *Xenopus* and *Drosophila*, code for structurally related proteins with multiple C2H2 and C2HC zinc fingers (Cubadda *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 1997; Tevosian *et al.*, 1999; Deconinck *et al.*, 2000). They specifically recognize the GATA N-finger through some of their C2HC fingers (Fox *et al.*, 1998, 1999). Initially, FOG-1 was identified in mammals by a two-hybrid screen for factors that interact with the GATA-1 N-finger domain (Tsang *et al.*, 1997). The interaction between GATA-1 and FOG-1 is necessary for erythroid and megakaryocytic differentiation (Tsang *et al.*, 1998). Recently, human familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia has been associated with missense mutations in the GATA-1 N-finger that diminish or abrogate GATA-1–FOG-1 interaction, thereby highlighting the importance of this interaction *in vivo* (Nichols *et al.*, 2000; Mehaffey *et al.*, 2001). Concomitantly with the cloning of FOG-1, we identified the *Drosophila* FOG homologue *Ush* by virtue of its antagonism of *Pnr* during adult neurogenesis (Cubadda *et al.*, 1997; Haenlin *et al.*, 1997). In addition, *Drosophila* *Ush* and vertebrate FOG-2 were shown to participate in cardiogenesis in flies and in vertebrates, inhibiting *Pnr* and GATA-4 functions, respectively (Fossett *et al.*, 2000; Tevosian *et al.*, 2000). However, the precise mode of action of the GATA–FOG complex remains unclear. In fact, FOG can either repress or enhance GATA-mediated transactivation, depending on the cell and promoter context (Tsang *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 1999; Holmes *et al.*, 1999).

Recent evidence suggests that blood cell differentiation in vertebrates and in *Drosophila* shares a common molecular basis (Fossett and Schulz, 2001). During *Drosophila* embryogenesis, blood cells (haemocytes) originate from the procephalic mesoderm and differentiate into two known lineages: plasmatocytes and crystal cells (Tepass *et al.*, 1994; Lebestky *et al.*, 2000). The plasmatocytes migrate throughout the embryo along several invariant paths and act as macrophages (Cho *et al.*, 2002). They contribute to host defence by phagocytosing microbes, and they play a crucial role in normal development by eliminating apoptotic bodies. This

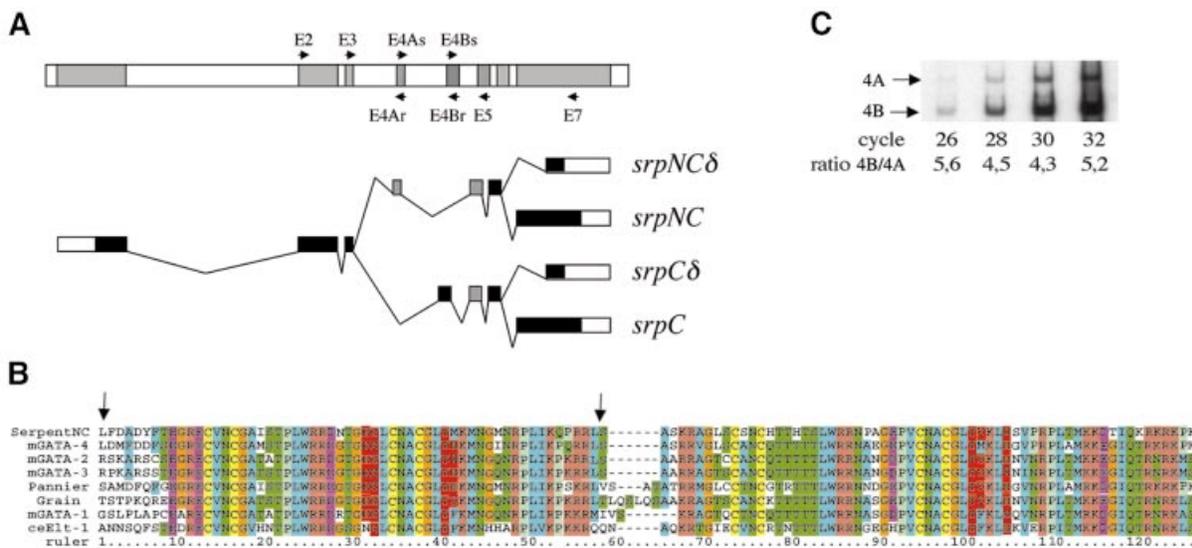


Fig. 1. (A) Schematic representation of the *srp* locus and alternatively spliced transcripts. The location and orientation of the primers used for RT-PCR analysis are indicated. The non-coding regions in *srp* transcripts are indicated as open boxes. Exons 4A and 5, coding for the N- and C-finger, respectively, are indicated as grey boxes. Exon 4A starts at position 121 031 and ends at 121 202 with reference to *Drosophila* scaffold region AE003711 (Flybase). Similarly, the internal splice acceptor site in exon 7 is located at position 123 288. (B) Alignment of the GATA zinc finger domains of SerpentNC with Pannier, Grain, mouse GATA-1, -2, -3 and -4 and *Caenorhabditis elegans* Elt-1. Arrows above the SrpNC sequence delineate the region coded by exon 4A. Conserved residues in each column are coloured according to the consensus character assigned to that column; brown, R and K; green, N, T, Q and S; purple, E and D; blue, I, F, L, A, V and M; red, H and Y; orange, G; light green, P; and yellow, C. (C) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *srp* transcripts containing either exon 4A or exon 4B. RT-PCR was performed with E3 and E5 primers on RNA extracted from stage 5–14 embryos. Aliquots of the PCR were taken after different numbers of cycles. Products containing exon 4A or 4B were resolved on acrylamide gel, and their relative amount was quantified.

activity is largely dependent on the expression of *croquemort*, a member of the CD36 receptor family (Franc *et al.*, 1999). They also participate in the synthesis of extracellular matrix components such as peroxidase (Nelson *et al.*, 1994). Crystal cells remain located around the proventriculus during embryogenesis and play a role in melanization, a defence-related process, during larval stages (Rizki *et al.*, 1980).

Several genes that control blood cell formation and differentiation in *Drosophila* have been identified. Expression of the GATA transcription factor Srp in the procephalic mesoderm is required for the formation and differentiation of both classes of haemocytes (Rehorn *et al.*, 1996). The transcription factor encoded by *glial cell missing* (*gcm*) is involved in plasmatocyte formation (Bernardoni *et al.*, 1997), whereas the Runt factor Lozenge (Lz) is absolutely required for crystal cell formation (Lebestky *et al.*, 2000). Finally, the *Drosophila* FOG protein, Ush, appears to repress crystal cell production (Fossett *et al.*, 2001). All these three genes require the activity of *srp* since in its absence none of them is expressed in the haematopoietic anlage. Yet it is still not understood how these genes control blood cell formation at the molecular level. Of particular interest is the case of Srp and Ush. So far, all known functions of FOG proteins seem to be mediated by GATA factors (see for example Chang *et al.*, 2002). Since Srp contains only a C-finger, it should be unable to interact with Ush. This suggests either that Ush has a GATA-independent function in haematopoiesis or that Ush acts via an uncharacterized GATA protein containing an N-finger.

In order to gain insight into the molecular mechanisms controlling blood cell formation, we sought new potential GATA protein-encoding genes in the *Drosophila* genome. We found that the *srp* locus contains an N-finger-coding exon that is alternatively spliced to give rise to proteins that contain either a C-finger (SrpC) only or both an N-finger and a C-finger (SrpNC). We have characterized these two isoforms *in vitro* and *in vivo* during haematopoiesis. Interestingly, we show that SrpC and SrpNC have both common and distinct activities. Finally, we provide evidence that Ush interacts with SrpNC and regulates its activity with respect to specific target genes. We propose that the co-expression of Srp proteins containing either one or two zinc fingers provides an extension of the regulatory properties of *srp*, consistent with its broad range of functions during development.

Results

serpent encodes isoforms including N and C zinc fingers

In a systematic search for GATA zinc finger-coding sequences in the *Drosophila* genome, we found five genes (see Materials and methods for details): *dGATA-E* (CG10278), *dGATA-D* (CG5034), *pnr*, *grain* and *srp*. *dGATA-E* and *dGATA-D* appear to include only a C-finger, while *Pnr* and *Grain* have already been shown to contain both an N- and a C-finger (Ramain *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995). Interestingly, while Srp was reported previously to contain a single C-finger, our search revealed the presence of a putative exon (E4A) coding for an

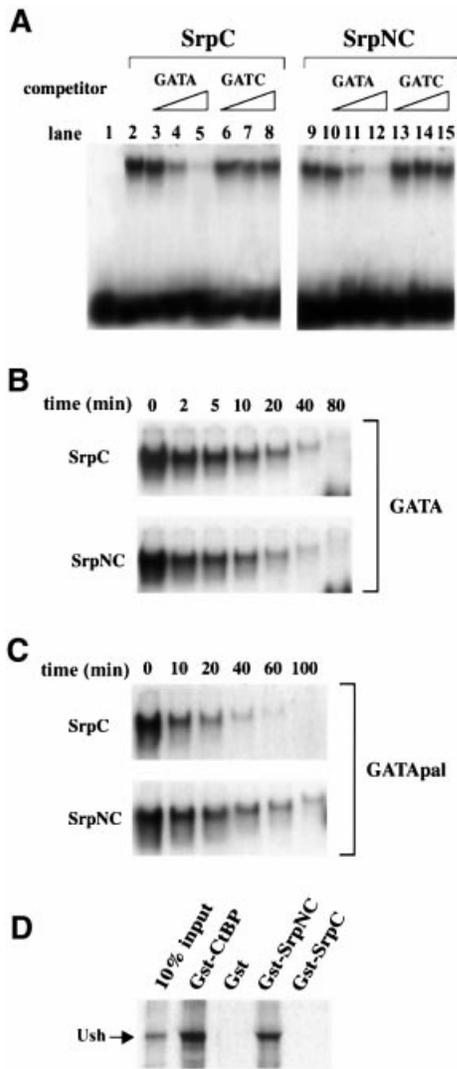


Fig. 2. (A–C) EMSAs using *in vitro* translated SrpC or SrpNC proteins. (A) SrpC and SrpNC both specifically bind a consensus GATA probe. Increasing concentrations (5- to 500-fold excess) of unlabelled wild-type (GATA) or mutant (GATC) competitors were added to the reaction as indicated in the upper part of the panel. No GATA-binding activity was observed with unprogrammed reticulocyte lysate (lane 1). (B and C) SrpC and SrpNC have distinct site-dependent binding properties as revealed by dissociation rate assays. After formation of the complexes between SrpC (upper panel) or SrpNC (lower panel) with either a single GATA site (B) or a palindromic double GATA site (C), an excess of the corresponding unlabelled oligonucleotides was added to the reaction mix and samples were loaded on the gel at various times, as indicated. (D) Only SrpNC interacts with Ush *in vitro*. Equivalent molar amounts of the GST fusion proteins were tested for their interaction with *in vitro* translated ³⁵S-labelled Ush as indicated in the upper part of the panel.

N-finger motif in *srp*. Using RT-PCR assays with various combinations of oligonucleotides (see Materials and methods and Figure 1A), we showed that E4A is expressed and that E4A and E4B are alternatively spliced to exon 5 (data not shown). In the course of these experiments, we also identified an additional splice acceptor site within E7 (Figure 1A). This downstream acceptor site in E7 is out-of-frame and leads to the deletion of the Srp glutamine-rich C-terminal region. Our data indicate that four alternatively spliced mRNAs are transcribed from *srp*,

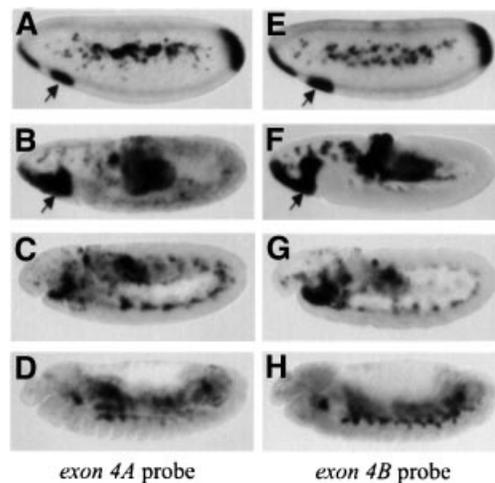


Fig. 3. The transcripts containing either exon 4A (*srpNC* and *srpNCδ*) or exon 4B (*srpC* and *srpCδ*) have similar expression patterns during embryogenesis. Side views of stage 5 (A and E), stage 8 (B and F), stage 11 (C and G) or stage 14 (D and H) embryos hybridized with an RNA probe directed against either exon 4A (A–D) or exon 4B (E–H). Arrows indicate the expression of *srp* in the haemocyte primordium.

two encoding products with a single C-finger (SrpC and SrpCδ) and two encoding products with both N- and C-fingers (SrpNC and SrpNCδ) (Figure 1A). Interestingly, in SrpNC and SrpNCδ, the two fingers present the same conserved organization as in other GATA factors (Figure 1B). Notably, they are separated by 29 amino acids, as in all vertebrate GATA. In the following experiments, we used the two isoforms that contain the full-length exon 7, i.e. *srpC* and *srpNC*, to address the functional consequences of the alternative splicing of E4A and E4B.

SrpNC shows specific features of a two-fingered GATA factor

We first determined whether SrpC and SrpNC displayed different properties *in vitro*. While the C-finger is necessary and sufficient for specific DNA binding, it has also been shown in vertebrates that the N-finger can stabilize the binding to particular double GATA sites (Trainor *et al.*, 1996). We tested, by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), whether SrpNC and SrpC had similar DNA-binding properties. As shown in Figure 2A (lanes 2 and 9), both *in vitro* translated SrpC and SrpNC proteins bound to an oligonucleotide containing a consensus GATA site. The binding was specific, since it could be competed out efficiently by an excess of cold GATA oligonucleotide (Figure 2A, lanes 3–5 and 10–12), but not by an excess of the GATC oligonucleotide (Figure 2A, lanes 6–8 and 13–15). The stability of the SrpC and SrpNC complex on a single or on a palindromic GATA site was assessed by dissociation experiments. While the rate of dissociation was similar for SrpC and SrpNC on a single GATA probe (Figure 2B), SrpNC bound more stably than SrpC to the palindromic GATA sites (Figure 2C).

The GATA N-finger allows interaction with cofactors of the FOG family (Fox *et al.*, 1998). Key residues that are required for the interaction between GATA and FOG are conserved in the Srp N-finger. In order to test the binding between Ush and *srp* products, we performed pull-down

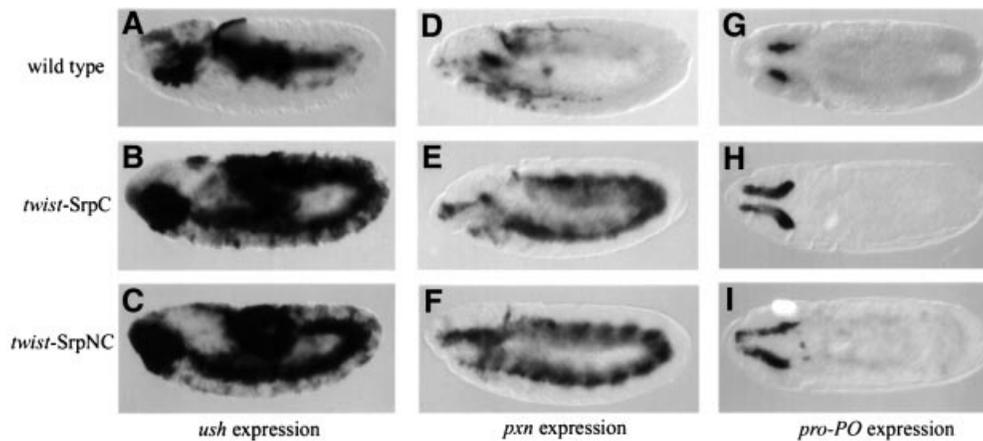


Fig. 4. SrpC and SrpNC have a similar capacity to activate ectopically the expression of *ush*, *pxn* and *pro-PO*. (A–C) Side views of *ush* mRNA expression in stage 10 embryos. (D–F) Side views of *pxn* mRNA expression in stage 11 embryos. (G–I) Dorsal views of *pro-PO* mRNA expression in stage 11 embryos. (A, D and G) Wild type, (B, E and H) *twist-Gal4*; UAS-SrpC and (C, F and I) *twist-Gal4*; UAS-SrpNC.

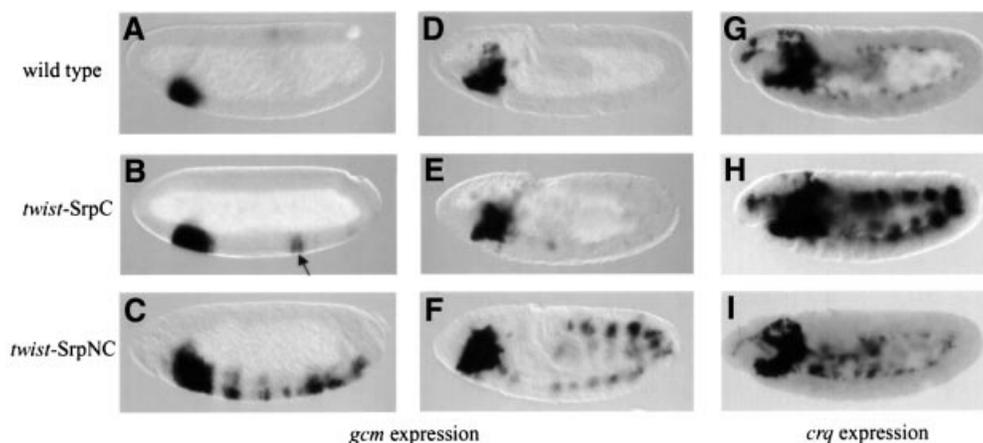


Fig. 5. SrpC and SrpNC differentially activate *gcm* and *crq* expression. (A–F) Side views of *gcm* mRNA expression in stage 5 (A–C) or stage 9 (D–F) embryos. (G–I) Side views of *crq* mRNA expression in stage 10 embryos. (A, D and G) Wild type, (B, E and H) *twist-Gal4*; UAS-SrpC and (C, F and I) *twist-Gal4*; UAS-SrpNC. The arrow in (B) points to the few cells that express *gcm* ectopically in response to SrpC.

assays *in vitro*. We found that *in vitro* translated [³⁵S]methionine-labelled Ush bound to GST–SrpNC, but not to GST alone nor to GST–SrpC (Figure 2D). Thus, Ush specifically interacts with Srp isoforms that contain the N-finger. In addition, like its vertebrate homologues (Fox *et al.*, 1999), Ush interacted with the transcriptional corepressor dCtBP in this assay (Figure 2D).

Taken together, our results indicate that SrpNC displays features characteristic of two-fingered GATA factors. The two types of naturally occurring isoforms encoded by *srp* (with or without the N-finger) have different DNA-binding properties, and only the isoforms including an N-finger can interact with Ush.

***srpC* and *srpNC* transcripts have identical expression patterns**

In order to determine whether a spatial regulation of the alternative splicing leading to SrpC and SrpNC occurs during embryonic development, we assessed the distribution of the corresponding *srp* transcripts by *in situ* hybridization using specific probes for exon 4A or 4B. At the blastoderm stage and during gastrulation, *srpC* and *srpNC* show the same expression pattern (Figure 3A, B, E

and F). They are expressed in the procephalic mesoderm, the haemocyte primordium (arrows in Figure 3), at the anterior and posterior pole, in the primordium of the anterior and posterior midgut as well as in the amnioserosa and in the yolk cells. Later, during germ band extension, and after germ band retraction, *srpC* and *srpNC* are expressed identically in the developing fat body (Figure 3C, D, G and H) (for a full description of *srp* expression see Rehorn *et al.*, 1996). Thus, *srpC* and *srpNC* transcripts are not differentially regulated spatially during embryonic development. However, the level of the transcripts is not identical. Indeed, by means of semi-quantitative RT–PCR, we determined that exon 4B-containing mRNA is five times more abundant than exon 4A-containing mRNA (Figure 1C), suggesting that two-fingered isoforms of Srp are less abundant than single-fingered isoforms.

SrpC* and *SrpNC* differ in their capacity to activate certain target genes *in vivo

In order to analyse SrpC and SrpNC activities, we tested their capacities to activate gene expression *in vivo* during *Drosophila* embryonic haematopoiesis. Using the

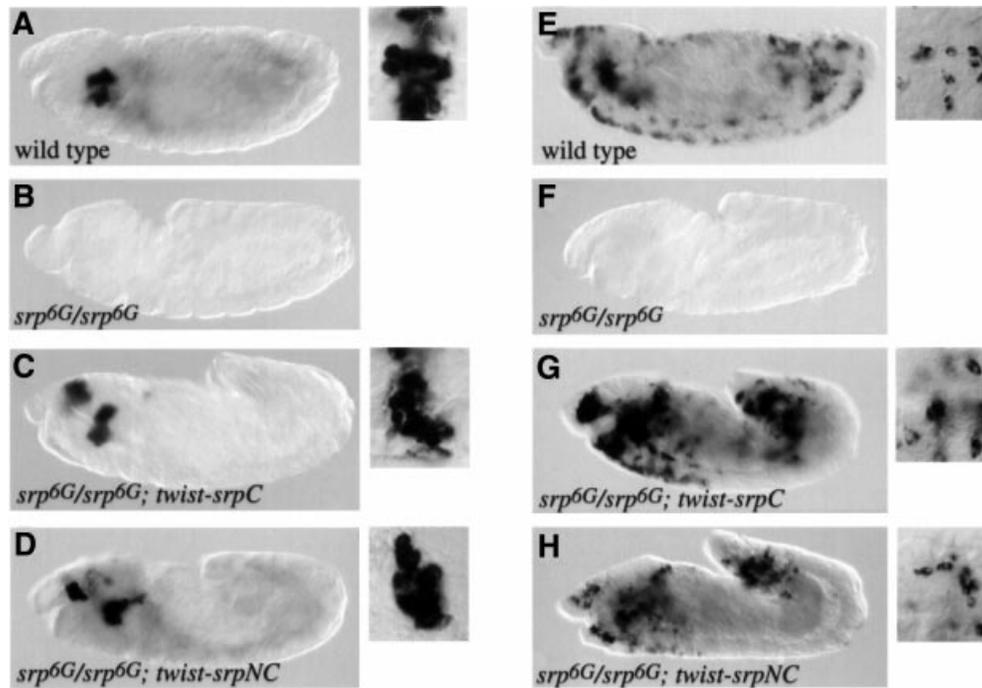


Fig. 6. SrpC and SrpNC individually can rescue the lack of crystal cells and plasmatocytes due to an *srp* null mutation. *In situ* hybridization revealing *pro-PO* (A–D) or *pxn* (E–H) expression in stage 13–14 embryos. (A and E) Wild type, (B and F) *srp^{6G}/srp^{6G}*, (C and G) *twist-Gal4/+; UAS-SrpC; srp^{6G}/srp^{6G}* and (D and H) *twist-Gal4/UAS-SrpNC; srp^{6G}/srp^{6G}*. Ten-fold higher magnifications of labelled cells are shown to the right of the wild-type and rescued embryo panels.

UAS-GAL4 system, we ectopically expressed them in the mesoderm and we then assessed the expression pattern of various haematopoietic markers.

The two genes *ush* and *gcm* play critical roles in embryonic haematopoiesis. Their expression in the haematopoietic primordium occurs early and appears to depend on *srp* activity (Bernardoni *et al.*, 1997; Fossett *et al.*, 2001). Therefore, we decided to determine whether they are transcriptional targets of SrpC and/or SrpNC. We found that, whereas in a wild-type early embryo, *ush* expression is restricted to the anterior mesoderm, *twist*-driven expression of SrpC (*twist-SrpC*) or SrpNC (*twist-SrpNC*) induced strong expression of *ush* throughout the mesoderm (Figure 4, compare A with B and C). In contrast, *twist-SrpC* induced *gcm* expression poorly and in a limited number of mesodermal cells of stage 5 embryos (arrow in Figure 5B), whereas *twist-SrpNC* strongly activated *gcm* expression segmentally from stage 5 to 9 (Figure 5C and F).

Next we looked at the expression of haematopoietic lineage-specific markers. As plasmatocyte markers, we used *peroxidasin* (*pxn*) and *croquemort* (*crq*). Since, Rizki *et al.* (1980) suggested that crystal cells are the only source of prophenoloxidase (pro-PO) in *Drosophila*, we used expression of this gene to monitor crystal cell formation. *pro-PO* transcripts were indeed detected in these cells from early stage 11 to the end of embryogenesis. We confirmed that *pro-PO* expression is specific to the crystal cells since it was not detected in *lz* mutant embryos (data not shown). Analysing these markers, we again observed two situations. On the one hand, *twist-SrpC* and *twist-SrpNC* had similar abilities to induce expression of the plasmatocyte marker *pxn* and of the crystal cell marker

pro-PO (Figure 4E and F, and H and I, respectively). On the other hand, expression of *crq* was induced by *twist-SrpC* but not by *twist-SrpNC* (Figure 5, compare H with I). Note that *pxn* and *crq* were induced through most of the mesoderm, while *pro-PO* activation was restricted to the head region.

Taken together, our data show that SrpC and SrpNC have both common and different activities during haematopoiesis. Indeed, both isoforms activated the expression of *ush*, *pxn* and *pro-PO* in a similar manner. However, SrpC and SrpNC differentially stimulate the expression of *crq* and *gcm*, respectively, in the mesoderm.

***SrpC* and *SrpNC* both induce the crystal cell and plasmatocyte lineages in an *srp* null embryo**

srp is absolutely required for determination of all haematopoietic lineages (Rehorn *et al.*, 1996; Lebestky *et al.*, 2000). However, the relative contributions of SrpC and SrpNC to this process are unknown, since there is no known mutation in *srp* that affects only one of the two classes of isoforms. To address this question, we asked whether SrpC and SrpNC individually could rescue the plasmatocyte and/or crystal cell lineages in an *srp* mutant background. During haematopoiesis, *srp* expression is first detected at the blastoderm stage in a patch of cells within the mesoderm. Therefore, we used the *twist-Gal4* driver to express UAS-SrpC or UAS-SrpNC in the mesoderm of *srp* mutant embryos. To monitor crystal cell formation and plasmatocyte formation, we assessed the expression of *pro-PO* and *pxn*, respectively. Whereas no *pro-PO* expression was detected in *srp* mutant embryos, *pro-PO* expression was restored around the proventriculus and in an additional patch of cells located above the pharynx

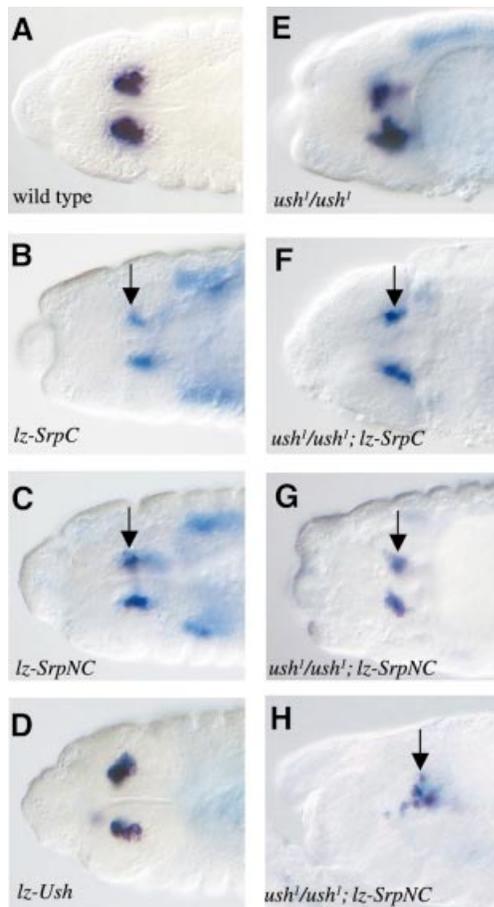


Fig. 7. Forced expression of SrpC or SrpNC in the crystal cells represses their formation independently of *ush*. Side views (A–G) or dorsal view (H) of stage 13 embryos processed to reveal *pro-PO* mRNA expression (black staining) and either *srp* mRNA expression (blue staining in B, C, F, G and H) or *ush* mRNA expression (blue staining in D). (A) Wild type, (B) *lz-Gal4*⁺; UAS-SrpC, (C) *lz-Gal4*⁺; UAS-SrpNC, (D) *lz-Gal4*⁺; UAS-Ush, (E) *ush*¹/*ush*¹, (F) *lz-Gal4*⁺; *ush*¹/*ush*¹; UAS-SrpC and (G and H) *lz-Gal4*⁺; *ush*¹/*ush*¹; UAS-SrpNC. Arrows indicate crystal cells expressing *srp* but not *pro-PO*.

upon expression of *twist*-SrpC or *twist*-SrpNC (Figure 6, compare B with C and D). This phenotype is equivalent to that which we observed previously in wild-type embryos expressing *twist*-SrpC or *twist*-SrpNC. Higher magnification views showed that the *pro-PO*-expressing cells had the typical morphology of crystal cells. Similarly, no expression of *pxn* was detected in *srp* mutant embryos, while scattered *pxn*-positive cells were observed in *srp* embryos expressing *twist*-SrpC or *twist*-SrpNC (Figure 6, compare F with G and H). Morphological analysis confirmed that these cells were genuine plasmatocytes (Tepass et al., 1994). Thus our results suggest that SrpC and SrpNC are each able to induce the formation of both lineages.

Misexpression of SrpC or SrpNC controls crystal cell formation independently of Ush

Previous studies have shown that *ush* acts to repress crystal cell formation. Notably, Fossett et al. (2001) showed that *lz-Gal4*-driven expression of UAS-Ush led to a variable decrease in the number of crystal cells, as monitored by the

expression of a *Uas-lacZ* reporter gene driven by *lz-Gal4*. However, the molecular mechanism of action of *ush* in this process remained largely unknown. The expression of SrpNC during haematopoiesis suggested that it might act with Ush. Thus we decided to analyse the consequences of misexpressing either SrpC or SrpNC in the crystal cells. Because only SrpNC can interact with Ush, we surmised that SrpNC, but not SrpC, would repress crystal cell formation. We used the *lz-Gal4* driver to express UAS-SrpC, UAS-SrpNC or UAS-Ush in the crystal cells. Misexpression of each transgene was visualized by *in situ* hybridization with a probe against *srp* or *ush*, respectively, and differentiation of the crystal cells was monitored by analysing *pro-PO* expression. As expected, UAS-Ush induced a reduction in the number of crystal cells in stage 13–16 embryos (Figure 7, compare A with D). Surprisingly, both UAS-SrpC and UAS-SrpNC also reduced the number of crystal cells (Figure 7B and C). Note that the reduction induced by SrpC or SrpNC was greater than that observed with Ush, although, as for Ush, we observed considerable variations of phenotype within the population of embryos. Most interestingly, we observed strong expression of UAS-SrpC or UAS-SrpNC driven by *lz-Gal4* and no expression of *pro-PO* in the same cells in stage 13–16 embryos (arrows in Figure 7B and C). In contrast, *lz-Gal4*-driven expression of UAS-Ush did not prevent *pro-PO* expression in these cells (Figure 7D). This suggests that SrpC and SrpNC can control both the number and the differentiation of the crystal cells, while Ush only affects their number.

However, it still remained possible that SrpNC was acting in a complex with Ush to prevent crystal cell formation and differentiation. Additionally, the effect of SrpC and SrpNC on crystal cell number could be related to Ush activity, since SrpC and SrpNC can induce its expression (at least in the mesoderm, see above). In order to test this hypothesis, we misexpressed UAS-SrpC or UAS-SrpNC under the control of *lz-Gal4* in an *ush* null mutant background. As shown in Figure 7F, G and H, even under these conditions, SrpC and SrpNC reduced the number of crystal cells and repressed *pro-PO* expression. Therefore, SrpC and SrpNC can both inhibit crystal cell formation and differentiation independently of *ush* activity.

The SrpNC–Ush complex represses *crq* expression

We have shown that the misexpression of SrpC, but not SrpNC, activates ectopic expression of *crq*. Conversely, SrpNC is a much stronger activator of *gcm* expression than SrpC. These differences in activity on particular target genes could be due to the capacity of SrpNC, unlike SrpC, to form a complex with Ush. Given that *twist*-SrpNC induces *ush* expression in the mesoderm, it is possible that Ush exerts a feedback action on SrpNC, preventing it from activating *crq* expression and/or enhancing its capacity to activate *gcm*. We decided to check this possibility by assaying the expression of *crq* and *gcm* in an *ush* mutant embryo expressing *twist*-SrpNC. The absence of *ush* had no detectable effect on the activation of *gcm* by *twist*-SrpNC, showing that *ush* is not involved in this specific activity of SrpNC (data not shown). On the contrary, we observed ectopic expression of *crq* by *twist*-SrpNC in the absence of *ush* function (Figure 8, compare A and B with C). Note that *twist*-SrpC-mediated

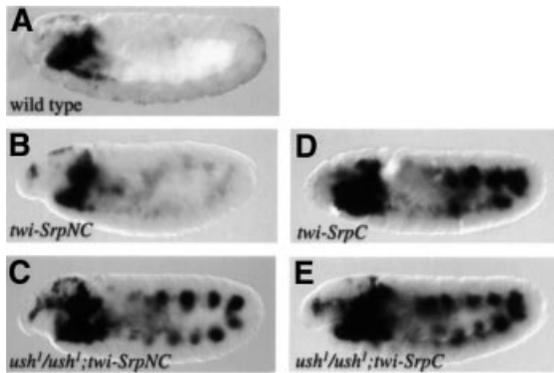


Fig. 8. *ush* inhibits SrpNC-mediated activation of *crq*. Side views of *crq* mRNA expression in stage 10 embryos. (A) Wild type, (B) *twist-SrpNC*, (C) *twist-Gal4/+; ush^{1/ush¹}; UAS-SrpNC*, (D) *twist-Gal4/+; UAS-SrpC* and (E) *twist-Gal4/+; ush^{1/ush¹}; UAS-SrpC*.

activation of *crq* was similar in a wild-type and *ush* mutant embryo (Figure 8, compare D with E). These data strongly suggest that Ush can form a complex with SrpNC, thereby modulating the transactivation of *crq*.

This also led us to consider that *ush* might repress the expression of *crq* in the wild-type embryo. We thus assayed *crq* expression in an *ush* mutant. In wild-type stage 11 embryos, the expression of *crq* was barely detectable in migrating plasmatocytes, especially those localized beyond the head (Figure 9A). However, the level of expression of *crq* was increased in *ush* mutants, and *crq*-positive plasmatocytes were clearly visible in the trunk region (Figure 9B). Moreover, in *ush* embryos, the expression of *crq* persisted longer than in wild type (Figure 9, compare C with D). Note that this effect was specific to *crq*, as the expression of *pxn* in the plasmatocytes appeared normal in *ush* mutant embryos (data not shown). These observations are consistent with a role for Ush in the control of *crq* expression in association with SrpNC. In conclusion, these results support the idea that some, but not all, of the differential activities of SrpC and SrpNC *in vivo* depend on a physical interaction between SrpNC and Ush.

Discussion

We have identified new isoforms, encoded by the previously characterized gene *srp*, which are produced by alternative splicing. The alternative use of exon 4A and 4B allows the production of GATA proteins containing either a single C-finger or both N- and C-fingers. Analysis of the expression pattern of these isoforms indicated that the splicing mechanism is not spatially regulated and thus that isoforms with one or two fingers most probably co-exist in the same cells. We also identified a new splice acceptor site within exon 7. Use of this internal site leads to the synthesis of Srp proteins with a shorter C-terminal region. The Srp C-terminal domain has no significant homology to other proteins suggestive of a possible function. Here, we have focused our study on the functional differences of GATA factors harbouring one or two zinc fingers and

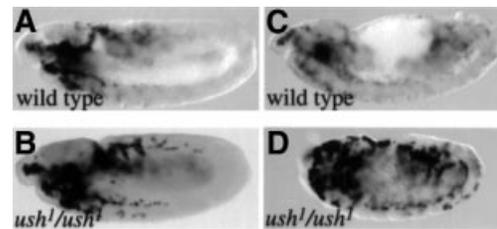


Fig. 9. *ush* downregulates *crq* expression. Side views of *crq* mRNA expression in stage 11 (A and B) or 14 (C and D) embryos. (A and C) Wild type, (B and D) *ush^{1/ush¹}*.

on the characterization of the two isoforms SrpC and SrpNC.

***SrpC* and *SrpNC* have common and different features**

It is remarkable that *srp* encodes both single and dual zinc finger-containing products. Our results provide strong evidence that this alternative splicing allows production of transcription factors with specific activities. On the one hand, the two isoforms activated the expression of *ush* and *pxn* with similar efficiency, suggesting that SrpC and SrpNC have similar transactivating properties *in vivo*. On the other hand, SrpC, but not SrpNC, activated *crq* expression, while SrpNC was a much stronger activator of *gcm* expression than SrpC. The domain coded by exon 4B that is present only in SrpC has no known motif and we do not know if and how it participates in SrpC-specific function. However, the presence of the N-terminal zinc finger encoded by exon 4A may explain some of the distinct features of SrpNC as discussed below.

We show that, as in the case of vertebrate GATA-1, the presence of the N-finger in Srp stabilizes binding to double palindromic GATA sites. Although the N-finger of GATA-1 modulates the binding and the transactivating properties of GATA-1 on synthetic promoters (Trainor *et al.*, 2000), the functional importance of these effects has remained elusive, particularly as no GATA-1 isoform contains only the C-finger. In the case of *srp*, these distinct binding properties may have direct functional consequences. For instance, the fact that SrpC and SrpNC activate a common target, *ush*, whereas only SrpNC strongly activates a specific target, *gcm*, could be related to the DNA-binding specificity of the two isoforms. A scan of the *ush* upstream regulatory region shows that it contains several GATA consensus sequences, nine of which are clustered in <1 kb and are organized as three repetitions of three sites. In contrast, GATA sites are far less frequent in *gcm* regulatory regions and are often organized in palindromes. Considering that *ush* and *gcm* are likely to be direct target genes for *srp*, the different organization of their regulatory regions may explain the differential effect we observed.

SrpC* and *SrpNC* can both induce blood cell formation in *Drosophila

We were able to rescue the lack of plasmatocyte and crystal cell formation due to an *srp* null mutation by expressing SrpC or SrpNC in the mesoderm. No difference between the two isoforms was seen in this assay, suggesting that the N-finger is not absolutely required for *srp* function in embryonic blood cell formation.

However, in the absence of a functional test, we cannot determine to what extent the formation of embryonic blood cells is fully rescued. Interestingly, rescue experiments with the mouse *GATA-1* mutant indicate that the GATA-1 N-finger is dispensable for primitive erythropoiesis but is required for definitive erythropoiesis (Shimizu *et al.*, 2001). In *Drosophila*, a second wave of haematopoiesis, occurring at the larval stage, gives rise to four different lineages: plasmotocytes, crystal cells, secretory cells and lamellocytes (Lanot *et al.*, 2001). *srp* is expressed in the dorsal lymph gland (i.e. the main larval haematopoietic organ) and it probably controls larval haematopoiesis (Lebestky *et al.*, 2000). By analogy to vertebrate GATA-1, the Srp N-finger may provide an additional function for larval haematopoiesis, perhaps during formation of the new cell types.

In our assay, the expression of the transgene was limited to the mesoderm but it still rescued blood cell formation. This finding suggests that the early expression of *srp* in the haematopoietic primordium is sufficient to initiate the genetic programme that controls haemocyte formation and differentiation. Interestingly, in the wild-type embryo, *srp* transcripts are not expressed detectably in haemocytes after stage 11, but Srp protein is detected in plasmotocytes and crystal cells throughout most of embryogenesis (Sam *et al.*, 1996; Lebestky *et al.*, 2000). Persistence of *srp* products in haemocytes might be critical for *srp* function, and control of *srp* products at the post-translational level may play a crucial role in the correct regulation of blood cell differentiation. Rescue of crystal cell formation by mesodermal expression of SrpC and SrpNC contrasts with the observation that later expression driven by *lz-Gal4* in crystal cells represses their development. Lebestky *et al.* (2000) reported that Srp levels were reduced in crystal cells compared with surrounding plasmotocytes. Therefore, our results are consistent with a two-step model in which Srp expression is first necessary to induce *lz* expression and subsequently is downregulated to allow crystal cell differentiation.

Ush regulates SrpNC activity on a specific target gene

One of the best characterized features of GATA N-fingers is their dimerization with cofactors of the FOG family. Consistent with this feature, we found that SrpNC interacts with the *Drosophila* FOG Ush, but SrpC does not. Previous analysis showed that *ush* regulates the number of crystal cells (Fossett *et al.*, 2001). It was proposed that this function of *ush* could be mediated by a putative isoform of Srp containing an N-finger. Our findings strongly support this hypothesis. However, it was not possible to address this issue directly, since both SrpC and SrpNC display a strong Ush-independent repressive effect on crystal cell formation and differentiation.

A new function of *ush* revealed here is the regulation of the level of expression of the macrophage receptor *crq*, suggesting that *ush* displays a broader function in haematopoiesis than previously assumed. Notably, we provide evidence that Ush modulates SrpNC transactivation of *crq*. As Ush interacts with the corepressor dCtBP *in vitro*, the Ush–SrpNC complex could repress *crq* expression. However, we do not know whether *crq* is a direct target of *srp*, so we cannot rule out the possibility

that the Ush–SrpNC complex activates a transcriptional repressor that regulates *crq*. Vertebrate FOGs can act as either a coactivator or a corepressor of GATA factors (Tsang *et al.*, 1997; Crispino *et al.*, 1999; Fox *et al.*, 1999; Deconinck *et al.*, 2000). In *Drosophila*, Ush was clearly shown to be a repressor of Pannier-induced activation in cell culture, and it probably also represses the expression of *achaete* in the dorso-central proneural cluster *in vivo* (Cubadda *et al.*, 1997; Haenlin *et al.*, 1997; Garcia-Garcia *et al.*, 1999). Furthermore, in a heterologous assay in *Drosophila*, the CtBP-binding region of mFOG2 was shown to be required for repressing the formation of crystal cells but not cardiac cells (Fossett *et al.*, 2000, 2001). Thus several mechanisms seem to regulate the function of the GATA–FOG complex.

Remarkably, some functions of SrpNC appear to be independent of Ush. Thus, *gcm*-specific activation by SrpNC is not affected in an *ush* mutant embryo. Moreover, SrpNC still represses crystal cell formation in the absence of *ush*. This is reminiscent of mouse erythropoiesis, where both FOG-dependent and FOG-independent regulation of gene expression by GATA-1 have been observed (Crispino *et al.*, 1999). The molecular mechanisms underlying the regulation by Ush/FOG-1 of SrpNC/GATA-1 activity on some specific targets remain to be elucidated. It is tempting to speculate that the N-finger of SrpNC is involved in the recognition of promoter sequences, on *gcm* for example, and thus is not available to recruit Ush. Alternatively, other cofactors already localized to the promoter or bound to SrpNC might prevent Ush binding to the N-finger.

srp is a structural and functional homologue of vertebrate GATA genes

We have focused our study on haematopoiesis, but *srp* also participates in other developmental processes, such as germ band retraction (Frank and Rushlow, 1996), midgut differentiation (Reuter, 1994), fat body formation (Hayes *et al.*, 2001), induction of the immune response (Petersen *et al.*, 1999) and the ecdysone response (Brodu *et al.*, 1999). It will be interesting to determine the respective roles of SrpC and SrpNC in these different phenomena. Phylogenetic analysis shows that SrpNC is closely related to vertebrate GATA factors. It has been suggested that *srp* is a functional homologue of the entire vertebrate GATA family, since *srp* is required in *Drosophila* for haematopoiesis, like GATA-1/2/3 in mice, and for endodermal development, like GATA-4/5/6 (Rehorn *et al.*, 1996). Nevertheless, this hypothesis was at odds with the fact that Srp seemingly had a single zinc finger while all the vertebrate GATAs have two (Lowry and Atchley, 2000). The present identification of Srp isoforms with two fingers gives new force to this hypothesis. Further, the expression of isoforms of Srp with distinct activities helps to account for the broad range of functions ensured by this gene.

It is worth noting that alternative splicing eliminating the N-finger has also been described in *Bombyx mori* GATA β (Drevet *et al.*, 1995) and in chicken GATA-5 genes (MacNeill *et al.*, 1997). Moreover, a BLAST search analysis revealed alternatively spliced human expressed sequence tags coding for two isoforms of a potential GATA factor with either one or two zinc fingers (L.Waltzer, unpublished results). This suggests that

alternative splicing of GATA genes could be more general than previously thought, and as yet unnoticed splice variants of GATA vertebrate genes may generate proteins with only a C-finger.

In conclusion, our results shed further light on the molecular control of haematopoiesis by the GATA factor Srp. The alternative splicing of *srp* gives rise to different Ush-interacting and non-interacting Srp proteins with different target gene specificities, thereby contributing to the exquisite control of *Drosophila* blood cell formation. We speculate that alternative splicing of the GATA N-finger might be an important mechanism regulating the activity of other GATA genes from insects to man.

Materials and methods

Fly stocks

The *twist-Gal4*, *lz-Gal4*, *srp^{6G}*, *ush¹* stocks were provided by the *Drosophila* Stock Center, Bloomington, IN. Several *Uas-SrpC* and *Uas-SrpNC* transgenic lines were generated by P-element-mediated germline transformation of the pUAST-*srpC* and pUAST-*srpNC* plasmids, respectively, into *w¹¹¹⁸* embryos according to standard protocols. *Uas-Ush* transgenic lines have already been described in Haenlin *et al.* (1997).

Embryos obtained from the mating of *Uas-SrpC*, *Uas-SrpNC* or *Uas-Ush* to *twist-Gal4* or *lz-Gal4* flies were collected at 25°C. To analyse the phenotype of the rescued *srp* mutant by SrpC or SrpNC, *twist-Gal4*; *srp^{6G}* *e/TM3*, *twist-lacZ* females were crossed to *Uas-SrpC*; *srp^{6G}* *e/TM3*, *twist-lacZ* or to *Uas-SrpNC*; *srp^{6G}* *e/TM3*, *twist-lacZ* males. *lacZ* staining was used to genotype the embryos. To analyse the effect of over-expression of SrpC or SrpNC on the production of crystal cells in an *ush* mutant background, *ush¹/CyO*; *Uas-SrpC* or *ush¹/CyO*; *Uas-SrpNC* females were crossed to *lz-Gal4/Y*, *ush¹/CyO* males. In order to observe the effect of mesodermal expression of SrpNC in *ush* mutant embryos, *twist-Gal4*; *ush¹/CyO* females were crossed to *ush¹/CyO*; *Uas-SrpNC* males. *ush* embryos were identified by their retraction phenotype. Embryos overexpressing SrpC or SrpNC were identified after *in situ* hybridization against *srp*.

Database search

In order to find all the potential GATA factor-encoding genes in the *Drosophila* genome, we used either the consensus GATA-type zinc finger sequence defined in PRODOM (reference PD000513), or the *Drosophila* GATA Pannier N-finger or C-finger sequences. These sequences were used as queries in three independent iterative PSI-BLAST searches against the database of predicted proteins encoded by the *Drosophila* genome (BLASTP). Pannier C-finger was also used as a query in a TBLASTN search against the whole *Drosophila* genomic sequence. Similar results were obtained in all searches.

RT-PCR

Total RNA was isolated from dechorionated embryos using Trizol™ according to the manufacturer's instructions. A 2 µg aliquot of RNA was used as a template in a 20 µl reverse transcription reaction with 0.5 µM *srp*-specific oligonucleotide reverse primer or 1 µM oligo(dT) primer. Reverse transcription reaction mixture (0.4 µl) was then used in a standard PCR in the presence of 0.5 µM specific primers. The RT-PCR products were checked on agarose gels, subcloned into pGemT easy vector (Promega) and sequenced.

To compare the levels of exon 4A- versus exon 4B-containing transcripts, reverse transcription was performed using the E5 primer. The PCR was performed in the presence of 0.5 µM E3 primer and a 0.5 µM ³²P end-labelled E5 primer. From cycle 20 onward, aliquots were preserved for analysis every two cycles to ensure that amplification was in the logarithmic phase. To facilitate the separation of exon 4A- and exon 4B-specific bands, the RT-PCR products were digested by *Pst*I before being run on a 4% acrylamide gel and quantified with a phosphoimager. RT-PCR experiments were repeated with three different preparations of RNA and gave similar results.

Forward primers used were the following: E2, 5'-TTATGCTGGC-TCGTTGCTTACTC-3'; E3, 5'-ATACCTGGTTCGATCCGTTAAGC-3', E4AS: 5-GTCAATGTGGTGCATTTC AAC-3'; and E4BS, 5'-TG-AATCAGGCGGGGATTCTAT-3'. Reverse primers used were the following: E4AR, 5'-GGCTGTTAATTAGGGGTCGATTC-3'; E4BR,

5-GGCGGACTAACTGCTCGTCG-3'; E5, 5'-ATGGTGCCTTTTT-CATGGTCAGT-3'; and E7, 5'-CAGCGTGC GCGCTACTCC-3'.

Plasmids

pBS-KS Srp, containing the SrpC open reading frame (ORF) (Brodu *et al.*, 1999), was a gift from C. Antoniewski. The full-length SrpNC ORF was cloned into pBS-KS by PCR. The resulting plasmid, pBS-SrpNC, was checked by sequencing. The SrpC or SrpNC ORF was subcloned into pUAST (for transgenesis) or into pGEX2TK (for GST fusion protein expression) by standard cloning techniques.

In situ hybridizations

In situ hybridizations were carried out as described previously using a Dig-UTP- or fluorescein-UTP-labelled antisense RNA probe (Peyrefitte *et al.*, 2001). RNA probes for *srp*, *ush*, *gcm* and *lacZ* have been described previously. To generate RNA probes for *srp* exon 4A, *srp* exon 4B, *crq* exon 3 or *pro-PO* exon 3, the corresponding DNA sequences were cloned by PCR in pGemTeasy. The corresponding antisense RNAs were transcribed *in vitro* using T7 or SP6 RNA polymerase.

Pull-down assays

pGEX2TK-SrpC, pGEX2TK-SrpNC, pGEX-dCtBP (a generous gift from M. Levine) and pGEX2TK plasmids were used to produce GST-SrpC, GST-SrpNC, GST-dCtBP and GST proteins, respectively, in *Escherichia coli* BL21. pBS-Ush cDNA (Cubadda *et al.*, 1997) was used as a template to produce full-length Ush protein *in vitro* using a coupled transcription/translation system (Promega) in the presence of [³⁵S]methionine. Interaction assays were performed as described in Waltzer and Bienz (1999).

Electrophoretic mobility shift assays

The following double-stranded oligonucleotides were used in EMSAs: GATA (5'-CTCCGGCAACTGATAAGGACTCCC-3'), GATC (5'-CTCCGGCAACTGATCAGGACTCCC-3') and GATApal (5'-CTCCGGCAACTATCAGATAAGGACTCCC-3'). EMSAs were performed by incubating *in vitro* translated SrpC or SrpNC with 5 × 10⁴ c.p.m. of 5'-end ³²P-labelled double-stranded GATA probe for 30 min at room temperature in 10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% glycerol and 0.5 µg poly(dI-dC) in a final volume of 20 µl. The stability of the protein-DNA complexes was assessed by dissociation rate experiments as described in Trainor *et al.* (1996), using a 200-fold excess of unlabelled probe. The reactions were loaded on to a 6% polyacrylamide gel with 0.5× TBE and run at room temperature at 15 V/cm. The protein-DNA complexes were visualized by autoradiography.

Acknowledgements

We are grateful to Professor J. Smith and Dr B.G. Monster for critically reading the manuscript, and B. Augé for expert technical assistance. This work was supported by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and from the Ministère de l'Éducation Supérieure et la Recherche (MESR) of France. S.P. was financed by graduate fellowships from the MESR and ARC.

References

- 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.
- Bernardoni, R., Vivancos, B. and Giangrande, A. (1997) *glide/gcm* is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev. Biol.*, **191**, 118–130.
- Brodu, V., Mugat, B., Roignant, J.Y., Lepesant, J.A. and Antoniewski, C. (1999) Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5732–5742.
- Chang, A.N., Cantor, A.B., Fujiwara, Y., Lodish, M.B., Droho, S., Crispino, J.D. and Orkin, S.H. (2002) GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 9237–9242.
- Cho, N.K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F. and Krasnow, M.A. (2002) Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell*, **108**, 865–876.
- Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P. and Orkin, S.H. (1999) Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein

- interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol. Cell*, **3**, 219–228.
- Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R.P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P. and Haenlin, M. (1997) *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during the formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**, 3083–3095.
- Deconinck, A.E., Mead, P.E., Tevosian, S.G., Crispino, J.D., Katz, S.G., Zon, L.I. and Orkin, S.H. (2000) FOG acts as a repressor of red blood cell development in *Xenopus*. *Development*, **127**, 2031–2040.
- Drevet, J.R., Swevers, L. and Iatrou, K. (1995) Developmental regulation of a silk worm gene encoding multiple GATA-type transcription factors by alternative splicing. *J. Mol. Biol.*, **246**, 43–53.
- Fossett, N. and Schulz, R.A. (2001) Functional conservation of hematopoietic factors in *Drosophila* and vertebrates. *Differentiation*, **69**, 83–90.
- Fossett, N., Zhang, Q., Gajewski, K., Choi, C.Y., Kim, Y. and Schulz, R.A. (2000) The multitype zinc-finger protein U-shaped functions in heart cell specification in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 7348–7353.
- Fossett, N., Tevosian, S.G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S.H. and Schulz, R.A. (2001) The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1 and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 7342–7347.
- Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., Mackay, J.P. and Crossley, M. (1998) Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33595–33603.
- Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M. (1999) Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J.*, **18**, 2812–2822.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A. and White, K. (1999) Requirement for *croquemort* in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science*, **284**, 1991–1994.
- Frank, L.H. and Rushlow, C. (1996) A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development*, **122**, 1343–1352.
- Garcia-Garcia, M.J., Romain, P., Simpson, P. and Modolell, J. (1999) Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development*, **126**, 3523–3532.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P. and Romain, P. (1997) Transcriptional activity of Pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**, 3096–3108.
- Hayes, S.A., Miller, J.M. and Hoshizaki, D.K. (2001) *serpent*, a GATA-like transcription factor gene, induces fat-cell development in *Drosophila melanogaster*. *Development*, **128**, 1193–1200.
- Holmes, M., Turner, J., Fox, A., Chisholm, O., Crossley, M. and Chong, B. (1999) hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23491–23498.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M. (2001) Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **230**, 243–257.
- Lebestky, T., Chang, D.T., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2000) Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science*, **288**, 146–149.
- Lin, W.H., Huang, L.H., Yeh, J.Y., Hoheisel, J., Lehrach, H., Sun, Y.H. and Tsai, S.F. (1995) Expression of a *Drosophila* GATA transcription factor in multiple tissues in the developing embryos. Identification of homozygous lethal mutants with P-element insertion at the promoter region. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25150–25158.
- Lowry, J.A. and Atchley, W.R. (2000) Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J. Mol. Evol.*, **50**, 103–115.
- MacNeill, C., Ayres, B., Laverriere, A.C. and Burch, J.B. (1997) Transcripts for functionally distinct isoforms of chicken GATA-5 are differentially expressed from alternative first exons. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8396–8401.
- Martin, D.I. and Orkin, S.H. (1990) Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.*, **4**, 1886–1898.
- Mehaffey, M.G., Newton, A.L., Gandhi, M.J., Crossley, M. and Drachman, J.G. (2001) X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of *GATA-1*. *Blood*, **98**, 2681–2688.
- Merika, M. and Orkin, S.H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3999–4010.
- Merika, M. and Orkin, S.H. (1995) Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2437–2447.
- Nelson, R.E., Fessler, L.I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D.R., Olson, P.F., Parker, C.G. and Fessler, J.H. (1994) Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.*, **13**, 3438–3447.
- Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M. and Weiss, M.J. (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in *GATA-1*. *Nat. Genet.*, **24**, 266–270.
- Patient, R.K. and McGhee, J.D. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 416–422.
- Petersen, U.M., Kadalayil, L., Rehorn, K.P., Hoshizaki, D.K., Reuter, R. and Engstrom, Y. (1999) Serpent regulates *Drosophila* immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. *EMBO J.*, **18**, 4013–4022.
- Peyrefitte, S., Kahn, D. and Haenlin, M. (2001) New members of the *Drosophila* Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix–loop–helix genes. *Mech. Dev.*, **104**, 99–104.
- Romain, P., Heitzler, P., Haenlin, M. and Simpson, P. (1993) *pannier*, a negative regulator of *achaete* and *scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development*, **119**, 1277–1291.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M. and Reuter, R. (1996) A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development*, **122**, 4023–4031.
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. and Skoultschi, A. (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.*, **13**, 1398–1411.
- Reuter, R. (1994) The gene serpent has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development*, **120**, 1123–1135.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M. and Grell, E. (1980) A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, **188**, 91–99.
- Sam, S., Leise, W. and Hoshizaki, D.K. (1996) The *serpent* gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development. *Mech. Dev.*, **60**, 197–205.
- Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (2001) *In vivo* requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *EMBO J.*, **20**, 5250–5260.
- Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A. and Hartenstein, V. (1994) Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development*, **120**, 1829–1837.
- Tevosian, S.G., Deconinck, A.E., Cantor, A.B., Rieff, H.I., Fujiwara, Y., Corfas, G. and Orkin, S.H. (1999) FOG-2: a novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 950–955.
- Tevosian, S.G., Deconinck, A.E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S.H., Izumo, S., Fujiwara, Y. and Orkin, S.H. (2000) FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell*, **101**, 729–739.
- Trainor, C.D., Omichinski, J.G., Vandergon, T.L., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. and Felsenfeld, G. (1996) A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2238–2247.
- Trainor, C.D., Ghirlando, R. and Simpson, M.A. (2000) GATA zinc finger interactions modulate DNA binding and transactivation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28157–28166.
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. and Orkin, S.H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**, 109–119.
- Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B. and Orkin, S.H. (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.*, **12**, 1176–1188.
- Waltzer, L. and Bienz, M. (1999) A function of CBP as a transcriptional co-activator during Dpp signalling. *EMBO J.*, **18**, 1630–1641.
- Weiss, M.J., Yu, C. and Orkin, S.H. (1997) Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1642–1651.

Received July 9, 2002; revised August 22, 2002;
accepted August 26, 2002

D. Discussion

Cette étude nous a permis de caractériser deux isoformes codées par le gène *srp*, et nous avons analysé l'activité de ces isoformes dans la régulation des gènes de l'hématopoïèse embryonnaire. Cependant plusieurs questions ne sont pas encore résolues. Notamment nous ne savons pas de manière précise quelles sont les fonctions spécifiques de chacune de ces isoformes au cours de ce processus, ni par quels mécanismes ces deux isoformes régulent l'expression des gènes cibles de manière différentielle. De plus, la mise en évidence de SrpC et SrpNC soulève de nouvelles questions quant au mode d'action du facteur GATA Srp dans d'autres processus. Dans le chapitre suivant, je vais donc discuter plus en avant ces différents points.

1. Fonctions de SrpC et SrpNC au cours de l'hématopoïèse embryonnaire

Afin de tester l'importance de SrpC et SrpNC dans le contrôle de l'hématopoïèse, étant donné qu'il n'existe pas de mutants perte de fonction spécifiques de chacune des isoformes, nous avons utilisé un contexte de sauvetage de la mutation nulle de *srp* par surexpression de SrpC ou SrpNC dans l'ensemble du mésoderme avec le driver pan-mésodermique *twist-gal4*. Par ailleurs, nous avons montré que la surexpression de SrpC ou SrpNC dans l'ensemble du mésoderme induisent des réponses différentielles. Il est donc surprenant de constater que SrpC et SrpNC induisent de manière similaire la formation des cellules à cristaux et des plasmacytes dans les tests de sauvetage. Cependant, nous n'avons pas analysé de façon approfondie ces phénotypes de sauvetage, par exemple en réalisant des comptages du nombre de cellules à cristaux *pro-PO+* et de plasmacytes *pxn+* dans chaque contexte afin de mettre en évidence une éventuelle activité différentielle de SrpC et SrpNC dans la formation des lignages hématopoïétiques. D'autre part, *gcm*, *lz* et *ush* sont impliqués dans la spécification et la différenciation des plasmacytes et des cellules à cristaux. L'analyse de l'expression de ces gènes dans les contextes de sauvetage pourrait permettre de mieux appréhender le rôle de chaque isoforme dans le contrôle de l'hématopoïèse embryonnaire.

Le contexte génétique utilisé pour les tests de sauvetage n'est que partiellement adapté pour comprendre les fonctions respectives de SrpC et SrpNC dans la régulation de l'hématopoïèse embryonnaire. En effet, deux problèmes majeurs sont associés à l'utilisation de ce contexte génétique (*twi-gal4* ; *uas-srp(N)C* ; *srp*^{-/-}) :

- Le driver *twi-gal4* dirige l'expression des constructions *uas-srpC* ou *uas-srpNC* non seulement dans le territoire d'apparition des prohématocytes mais aussi de manière ectopique dans l'ensemble du mésoderme. Or, nous avons montré que l'expression pan-mésodermique de chaque isoforme est capable d'induire l'expression ectopique de *pro-PO*, de *ush* et de *pxn*. Il est donc envisageable que les phénotypes de sauvetage soient dus, au moins partiellement, à l'expression ectopique de SrpC et SrpNC dans l'ensemble du mésoderme. Pour parer à cette éventualité nous avons envisagé de réaliser ces expériences de sauvetages avec un driver *srp-gal4* strictement exprimé dans le territoire hématopoïétique. Cependant ce driver ne s'exprime pas dans un contexte mutant pour *srp*.
- D'autre part, bien que les deux transcrits *srpC* et *srpNC* soient coexprimés au cours de l'hématopoïèse, nous avons montré par RT-PCR que les transcrits codants pour SrpC sont cinq fois plus abondants que ceux codants pour SrpNC. Cependant, *srp* est exprimé non seulement dans le domaine hématopoïétique mais aussi dans l'endoderme, l'amnioséreuse et le corps gras. La quantification relative des transcrits a été réalisée sur des embryons entiers et ne reflète donc pas forcément l'expression différentielle de *srpC* et *srpNC* au cours de l'hématopoïèse. Plusieurs questions se posent alors : (1) Est-ce que cette abondance différentielle des transcrits reflète effectivement une abondance différentielle des protéines SrpC et SrpNC au cours de l'hématopoïèse ? (2) Si oui, est ce que cette différence d'abondance a une conséquence fonctionnelle importante ? Notamment, en présence de Ush, le contrôle de la balance entre l'activité inductrice de SrpC et l'activité répressive du complexe SrpNC/Ush semble fondamentale dans le contrôle de l'hématopoïèse (voir ci-après) et les analyses précédentes de sauvetage par surexpression ne permettent pas d'aborder ce problème.

Nous avons donc envisagé de tester la fonction de SrpC et SrpNC au cours de l'hématopoïèse embryonnaire dans un contexte mutant perte de fonction spécifique de chaque isoforme. Pour cela nous avons envisagé d'inactiver spécifiquement SrpC ou SrpNC par

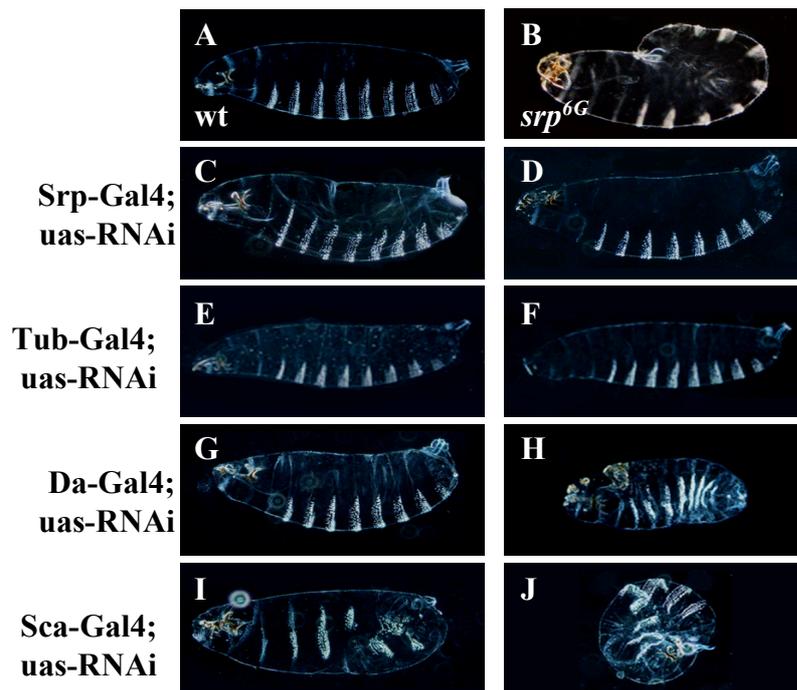


Figure 18 : Inactivation de *srp* par RNAi. Préparations de cuticules sur embryon wt (A), embryon *srp^{6G}* (B) ou sur les différents tests d'inactivation de *srp* par RNAi (C-J). Les différents géotypes sont mentionnés sur la figure.

RNAi en utilisant le système UAS/Gal4. Les exons 4a et 4b sont respectivement spécifiques de *srpNC* et *srpC*. Ces séquences d'environ 200 nucléotides sont théoriquement suffisantes pour inactiver spécifiquement chaque isoforme par RNAi.

Dans un premier temps, afin de valider la technique d'inactivation de *srp* par RNAi, j'ai testé une construction déjà existante uas-RNAi *srp* dirigée contre une région d'environ 250 nucléotides commune aux deux transcrits alternatifs (premier exon) (Roignant et al., 2003). Plusieurs conditions d'inductions ont été testées, soit par utilisation de drivers reproduisant l'expression de *srp* (*srp-gal4*), soit par utilisation de drivers ubiquitaires (*daughterless (da)-gal4*, *tubuline (tub)-gal4* ou *scabrous (sca)-gal4*). Dans ces différents contextes j'ai cherché à voir si l'on phénotypait le mutant nul de *srp* qui se caractérise par un défaut de rétraction de la bandelette germinative. Les phénotypes obtenus sont variables et ne reproduisent que de manière peu pénétrante le phénotype *srp* nul (Figure 18). Nous avons donc abandonné cette approche par inactivation par RNAi induite par le système UAS/Gal4. Cependant, une autre technique d'inactivation par injection directe d'ARN doubles brins au stade blastoderme pourrait être mieux adaptée à l'inactivation de gènes exprimés précocement au cours de l'embryogenèse et devrait permettre d'inactiver spécifiquement SrpC et SrpNC.

En conclusion, même si les expériences de surexpressions ectopiques pan-mésodermiques permettent de mettre en évidence des activités différentielles pour chaque isoforme de *srp*, l'analyse des phénotypes associés à une perte de fonction spécifique de SrpC ou SrpNC est indispensable pour déterminer la fonction spécifique des isoformes de ce facteur GATA au cours de l'hématopoïèse embryonnaire. Notamment, nous avons mis en évidence que *gcm*, qui est requis pour permettre la formation et la différenciation des plasmacytes, est induit de manière ectopique, spécifiquement par SrpNC. Cependant, l'importance fonctionnelle au cours de l'hématopoïèse de la régulation différentielle de l'expression de *gcm* par SrpC et SrpNC n'a, à ce jour, pas été mise en évidence.

2. Rôle du complexe SrpNC/Ush dans la régulation de l'hématopoïèse

Bien que l'importance fonctionnelle de chacune des isoformes SrpC et SrpNC, au cours de l'hématopoïèse, soit encore mal comprise, la caractérisation de l'isoforme SrpNC,

capable d'interagir avec le cofacteur Ush, a permis d'identifier des fonctions tardives de *srp* dans la régulation de la différenciation des deux populations d'hémocytes embryonnaires.

Ush est exprimé dans les précurseurs des hémocytes à partir du stade 8. Puis, Ush est spécifiquement maintenu dans les plasmacytes au cours de l'hématopoïèse (Fossett et al., 2001; Fossett et al., 2000). Aucun rôle de Ush dans la formation de ce lignage n'était décrit dans la littérature. Nous avons montré que la formation du complexe SrpNC/Ush est impliquée dans la répression de l'expression de *crq*, marqueur de différenciation des plasmacytes. Ces données mettent donc en évidence le rôle de *srp* et de *ush* dans la régulation de la différenciation de ce lignage.

D'autre part, au stade 10, il semble que certains des précurseurs Lz⁺ coexpriment Ush. Puis, le nombre de cellules qui coexpriment Lz et Ush diminue et en fin d'embryogenèse, les cellules Lz⁺ ne colocalisent plus avec Ush. Au cours de l'hématopoïèse, il a été montré que Ush réprime la formation des cellules à cristaux (Fossett et al., 2001). Comme l'activité des facteurs de type FOG passe par la formation d'un complexe avec un facteur de type GATA, notre hypothèse était que cette fonction de Ush passe par la formation d'un complexe avec SrpNC. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence *in vivo*, que l'activité répressive de Ush sur la formation de ce lignage est dépendante de Srp. En effet, pour aborder cette question, nous avons surexprimé SrpC ou SrpNC en présence ou en absence de Ush, spécifiquement dans les précurseurs des cellules à cristaux. Dans ce contexte, nous avons montré que la surexpression tardive de SrpC ou SrpNC dans les précurseurs Lz⁺ inhibe leur différenciation en cellules à cristaux indépendamment de Ush. Ceci suggère que la dose de Srp dans les précurseurs des cellules à cristaux est directement impliquée dans la régulation de la différenciation de ce lignage : un niveau d'expression de *srp* trop important maintient les précurseurs Lz⁺ à l'état indifférencié.

Néanmoins, une étude similaire menée par Fossett et al. a mis en évidence que Ush limite la formation des cellules à cristaux seulement lorsqu'il est lié à SrpNC (Fossett et al., 2003). En accord avec nos résultats, la surexpression pan-mésodermique de SrpC ou SrpNC induit la formation de cellules à cristaux surnuméraires. Par contre la surexpression précoce dans tout le mésoderme de SrpNC et Ush inhibe la formation de ce lignage, alors que la surexpression de SrpC et Ush est incapable d'inhiber la formation des cellules à cristaux. L'utilisation d'un contexte de surexpression différent a donc permis de démontrer que l'activité répressive de Ush sur la différenciation de ce lignage passe par la formation d'un complexe avec SrpNC. D'autre part, ces résultats suggèrent que le recrutement de Ush spécifiquement par cette isoforme, convertit la forme activatrice SrpNC en forme répressive

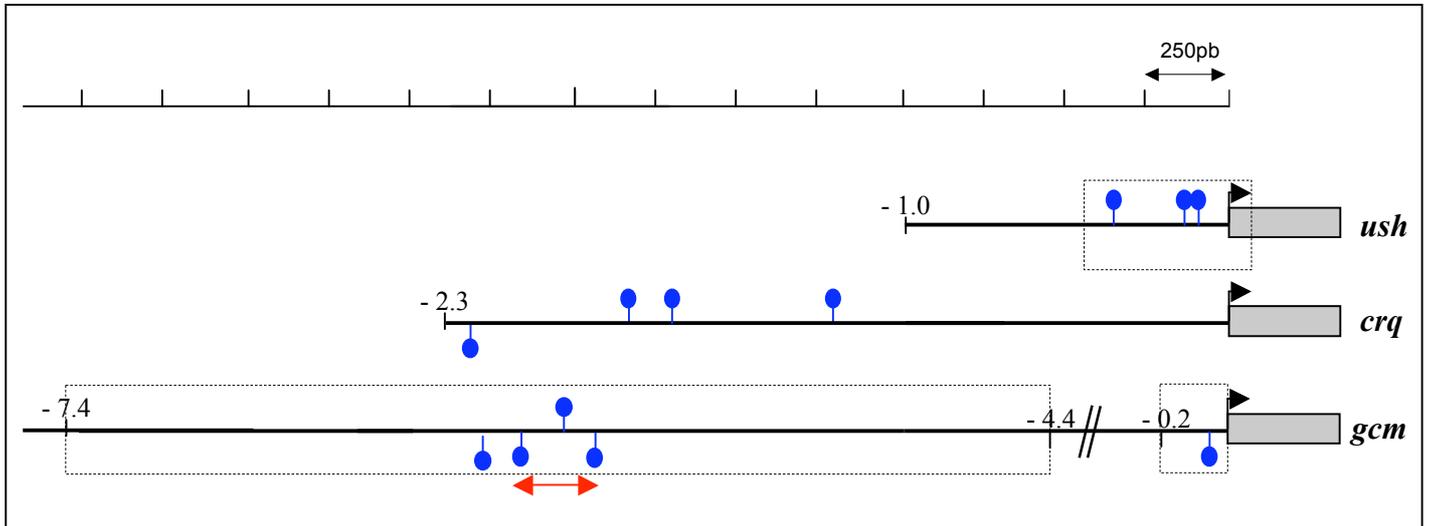


Figure 19 : Les promoteurs des gènes hématopoïétiques contiennent plusieurs sites GATA. Représentation schématique des promoteurs de *ush*, *crq* et *gcm*. Cartographie réalisée avec Mat Inspector // www.genomatix.de. Les points bleus représentent les sites de fixation de Srp. Le promoteur de *gcm* contient des sites GATA palindromiques (flèche rouge). En encadré, les séquences promotrices ou enhancer fonctionnels *in vivo* (d'après Lucas WALTZER, communication personnelle, et Jones et al., 2004).

ou inactive, lors du développement des cellules à cristaux. L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance de la stœchiométrie des facteurs SrpC, SrpNC et Ush lors de la formation de ce lignage.

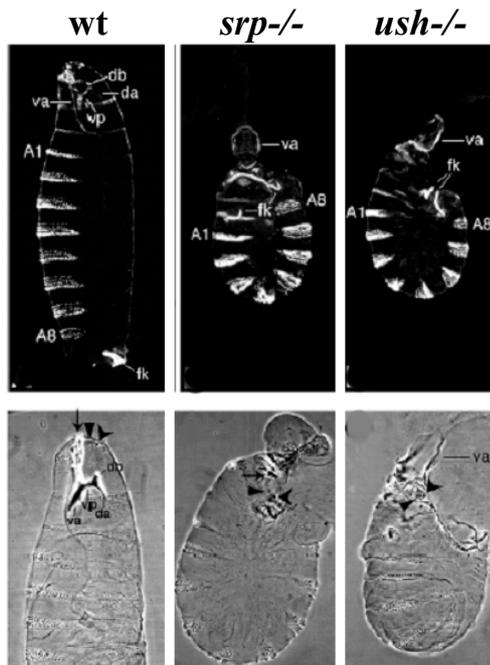
3. Régulation de l'expression des gènes cibles par SrpC et SrpNC

Nos résultats montrent que SrpC et SrpNC induisent de manière similaire certains gènes cibles (*ush*, *pxn* et *lz*), alors que *crq* et *gcm* sont préférentiellement induits respectivement en réponse à SrpC et à SrpNC. Ceci soulève plusieurs questions : (1) Est-ce que ces gènes sont des cibles directes de Srp ? (2) Si *gcm* est une cible directe de Srp, quel est le mécanisme qui dirige la reconnaissance spécifique de ce promoteur par SrpNC ? (3) De même, pourquoi le complexe SrpNC/Ush réprime t'il *crq* et pas d'autres cibles de Srp ?

Une analyse bioinformatique des promoteurs de ces gènes révèle la présence de plusieurs sites GATA dans les séquences en amont du démarrage de la transcription de plusieurs de ces gènes, ce qui fait d'eux des cibles potentiellement directes de Srp. Ainsi, les promoteurs de *ush* et de *crq* contiennent plusieurs sites GATA. Il est intéressant de noter que le promoteur de *gcm* contient lui aussi plusieurs sites GATA, mais ceux-ci sont organisés de façon palindromique (Figure 19).

Nous avons mis en évidence *in vitro* que la présence du doigt de zinc N-terminal de SrpNC augmente l'affinité de ce facteur pour les séquences GATA palindromiques. Cette donnée fournit un argument qui permet d'expliquer pourquoi *gcm* est préférentiellement induit par SrpNC et non par SrpC, l'affinité de SrpNC pour les sites GATA palindromiques étant supérieure à celle de SrpC pour ces mêmes sites. Le promoteur de *gcm* a été analysé et les séquences enhancer responsables de son expression au niveau du domaine hématopoïétique embryonnaire ont été isolées (Jones et al., 2004). Ces régions enhancers contiennent effectivement les sites GATA palindromiques, cependant, il reste à démontrer formellement que *gcm* est une cible directe de Srp. Il semble envisageable que la présence de sites GATA palindromiques soit une signature de reconnaissance spécifique du facteur Srp à deux doigts de zinc.

D'autre part, les promoteurs de *ush* et de *crq* contiennent tous deux plusieurs sites GATA. L'expression de *ush* est induite indifféremment par SrpC et SrpNC alors que l'expression de *crq* est induite par SrpC mais réprimée par le complexe SrpNC/Ush. Ces données montrent que SrpNC peut réguler l'expression de gènes cibles de manière



D'après Frank, Rushlow, 1996

Figure 20 : Les mutants de *srp* et de *ush* ont des phénotypes cuticulaires similaires. Préparations de cuticules sauvages ou de mutants *srp* ou *ush*. (ventral à gauche, antérieur en haut). Les deux mutants sont partiellement rétractés et ont des aspects similaires.

dépendante ou indépendante de Ush. De manière similaire, chez les vertébrés, GATA-1 régule l'expression de certains gènes cibles de manière FOG-dépendante ou FOG-indépendante (Crispino et al., 1999; Shimizu et al., 2001). Les mécanismes qui contrôlent la reconnaissance d'un site GATA par les facteurs GATA-1 et SrpNC seuls ou par les complexes GATA-1/FOG, SrpNC/Ush restent totalement inconnus. Il est envisageable que d'autres partenaires participent à la régulation de l'expression des cibles de Srp en fonction du contexte. L'analyse comparative des promoteurs des gènes cibles de Srp pourrait permettre d'identifier de nouveaux partenaires de Srp impliqués d'une part dans la régulation de la formation du complexe SrpNC/Ush ou de manière plus générale dans la régulation de l'activité de Srp. Cette hypothèse sera illustrée et discutée par la suite.

4. Fonctions de SrpC et SrpNC dans d'autres processus développementaux

Le gène *srp* est exprimé dans de nombreux domaines au cours du développement de la Drosophile. Ainsi au stade embryonnaire *srp* est exprimé selon un patron dynamique au niveau des cellules hématopoïétiques mais aussi dans les cellules précurseurs du corps gras, dans l'endoderme antérieur et postérieur, au niveau de l'amnioséreuse et tardivement dans les précurseurs de la glande lymphatique. De plus, plusieurs études ont montré que *srp* intervient dans la régulation de plusieurs processus (Frank and Rushlow, 1996; Hayes et al., 2001; Murakami et al., 2005; Rehorn et al., 1996; Sorrentino et al., 2005). Nous avons mis en évidence que les deux isoformes de Srp ont des activités différentielles. Cette donnée peut être importante pour comprendre les mécanismes de régulation dans lesquels *srp* intervient. D'autre part, *srp* est exprimé dans plusieurs territoires dont certains coexpriment *ush*. Par exemple, *ush* est exprimé dans les précurseurs du corps gras au stade embryonnaire (Fossett et al., 2000) et il a été montré que Srp induit le développement de ce type cellulaire (Hayes et al., 2001). Un autre exemple frappant vient de l'observation des phénotypes mutants pour *ush* et *srp* au stade embryonnaire (Figure 20) : la perte de fonction de *srp* induit un phénotype clairement identifiable d'absence de rétraction de la bandelette germinative. De même, en contexte mutant *ush*², on observe un défaut similaire de rétraction (Frank and Rushlow, 1996; Goldman-Levi et al., 1996). Les mécanismes qui contrôlent ce processus de rétraction de la bandelette germinative et qui impliquent un grand nombre de phénomènes distincts de migration et de mouvements morphogénétique sont encore mal compris. La caractérisation de

l'isoforme SrpNC, capable d'interagir avec le facteur FOG, Ush, devrait permettre de mieux comprendre comment certains processus sont régulés.

L'identification de ces isoformes ouvre de nombreuses pistes de recherche, je discuterais ici de la fonction potentielle de *srp* et *ush* lors de la spécification de la glande lymphatique et de la formation du cœur en fin d'embryogenèse. Entre 6 et 8 heures de développement, le mésoderme dorsal se sépare en mésoderme viscéral et mésoderme cardiogénique d'où sont issus la glande lymphatique et l'ensemble des cellules du cœur. Les précurseurs de la glande lymphatique, les cardioblastes et les cellules péricardiaques sont spécifiés lors de la rétraction de la bandelette germinative (8-10h après fertilisation). A ce stade, *ush* est exprimé dans le mésoderme cardiogénique. La perte de fonction de *ush* se traduit par une surproduction de cellules cardiaques et péricardiaques, alors que la surexpression de *ush* induit une diminution du nombre de cardioblastes. De plus, en culture cellulaire, Ush inhibe l'activation de l'enhancer de *D-mef2* qui est normalement induit par l'activité synergique de Panier et Tinman. Ces données suggèrent que Ush contrôle la spécification des cellules cardiaques en modulant l'activité transcriptionnelle du facteur GATA Pnr (Fossett et al., 2000). D'autre part, les données de la littérature suggèrent que la spécification des cardioblastes et des précurseurs hématopoïétiques fait intervenir à la fois Pnr et Srp. Pnr est exprimé précocement dans les cardioblastes. L'expression ectopique de *pnr* dans le mésoderme cardiogénique réprime la formation des cellules de la glande lymphatique (Mandal et al., 2004). A l'inverse, la surexpression de *srp*, comme la surexpression de *ush*, réprime la formation des cardioblastes et des cellules péricardiaques et induit une augmentation de la taille de la glande lymphatique (Han and Olson, 2005). Ces résultats mettent en évidence les fonctions antagonistes de ces deux facteurs GATA, Srp et Pnr dans la formation précoce de la glande lymphatique *versus* cardioblastes. Dans la mesure où le cofacteur Ush est également présent dans ces territoires, on peut se poser la question de son rôle dans la formation des précurseurs de la glande lymphatique. De plus, Srp coopère-t'il avec Ush pour spécifier les précurseurs de la glande et/ou inhiber la formation des cardioblastes ? Et existe-il une spécificité d'interaction entre Srp et Ush, d'une part et Pnr et Ush, d'autre part ?

Nos résultats concernant la caractérisation de l'activité transcriptionnelle de SrpC et SrpNC nous ont conduits à nous intéresser à un second type de complexe faisant intervenir les facteurs GATA et le facteur de transcription de type RUNX, Lozenge. Dans cette seconde partie de l'analyse de la fonction et du mode d'action de Srp au cours de l'hématopoïèse embryonnaire je vais donc présenter les résultats concernant cette seconde étude.

II. *Mise en évidence du complexe Srp/Lz*

A. Introduction

L'expression de *srp* est nécessaire pour permettre le développement des deux populations hématopoïétiques embryonnaires, plasmacytes et cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996) et comme nous l'avons montré précédemment, chaque isoforme SrpC et SrpNC est suffisante pour induire la formation de ces lignages. Plus précisément, nous avons montré que l'expression précoce pan-mésodermique de Srp (SrpC ou SrpNC) induit la formation ectopique de cellules à cristaux *pro-PO+*. Cependant les cellules à cristaux surnuméraires apparaissent uniquement dans la région antérieure de l'embryon. Ce résultat montre que l'ensemble du mésoderme n'est pas compétent pour induire l'expression des marqueurs de différenciation des cellules à cristaux en réponse à l'expression ectopique de Srp. Étant donné que l'expression de *lz* est nécessaire pour induire la formation des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000), ceci suggère que l'expression de *lozenge* est restreinte à la région antérieure de l'embryon. Ce résultat surprenant nous a donc conduit à analyser précisément la régulation de l'activité du facteur de transcription Lz par Srp lors de la différenciation des cellules à cristaux.

B. Résultats : résumé

Nous avons analysé la fonction et les mécanismes d'action de *lz* durant l'hématopoïèse. Nous avons montré que :

- (1) *Lz* induit le développement des cellules à cristaux, mais cette fonction de *Lz* est strictement dépendante de la présence de *Srp*.
- (2) *Srp* et *Lz* coopèrent pour induire le programme de différenciation des cellules à cristaux *in vivo*.
- (3) Ces deux facteurs de transcription interagissent *in vitro* directement *via* leurs domaines de liaison à l'ADN respectifs.
- (4) Cette interaction physique est conservée entre les mammifères et la *Drosophile*.
- (5) Enfin, nous avons montré que les facteurs GATA et RUNX synergisent pour activer la transcription de gènes rapporteurs en culture cellulaire.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction et la coopération entre les facteurs GATA et RUNX joue un rôle important dans la régulation de la formation des cellules sanguines.

C. Résultats : publication

Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during Drosophila hematopoiesis.

Lucas WALTZER, Géraldine FERJOUX, Laetitia BATAILLÉ and Marc HAENLIN
The EMBO Journal (2003) Vol.22 No 24 pp.6516-6525

Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis

Lucas Waltzer, Géraldine Ferjoux,
Laetitia Bataillé and Marc Haenlin¹

Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR 5547,
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

¹Corresponding author
e-mail: haenlin@cict.fr

Members of the GATA and RUNX families of genes appear to have conserved functions during hematopoiesis from *Drosophila* to mammals. In *Drosophila*, the GATA factor Serpent (Srp) is required in blood cell progenitors for the formation of the two populations of blood cells (plasmatocytes and crystal cells), while the RUNX factor Lozenge (Lz) is specifically required for crystal cell development. Here we investigate the function and the mechanisms of action of Lz during hematopoiesis. Our results indicate that Lz can trigger crystal cell development. Interestingly, we show that Lz function is strictly dependent on the presence of functional Srp and that Srp and Lz cooperate to induce crystal cell differentiation *in vivo*. Furthermore, we show that Srp and Lz directly interact *in vitro* and that this interaction is conserved between *Drosophila* and mammals. Moreover, both Srp and mouse GATA1 synergize with mouse RUNX1 to activate transcription. We propose that interaction and cooperation between GATA and RUNX factors may play an important role in regulating blood cell formation from *Drosophila* to mammals.

Keywords: *Drosophila*/GATA/hematopoiesis/RUNX

Introduction

Hematopoietic development provides an excellent paradigm to address how multipotent cells generate a spectrum of cell types through the combinatorial action of transcription factors (Orkin and Zon, 2002). Recent investigations suggest that *Drosophila* will prove to be a valuable model to study the mechanisms of hematopoietic cell fate choice. Indeed, various aspects of hematopoietic development have been conserved during evolution (Evans and Banerjee, 2003). As in vertebrates, *Drosophila* hematopoiesis occurs in two waves from mesodermally derived progenitors. First, during early embryogenesis, blood cells (hemocytes) originate from the head mesoderm (Tepass *et al.*, 1994). A second wave of hematopoiesis occurs during the larval stages in a specialized organ formed from the dorsal mesoderm, the lymph gland (Rizki, 1978). Hemocytes differentiate into two major classes: plasmatocytes and crystal cells (Lebestky *et al.*, 2000). Plasmatocytes, which represent 95% of the hemocytes, function as macrophages and play a crucial role in host defense and development (Tepass *et al.*, 1994; Franc *et al.*,

1996). Crystal cells participate in melanization, an insect-specific process involved in the encapsulation of foreign bodies and in wound healing (Rizki *et al.*, 1980). Functionally and morphologically, *Drosophila* blood cells most closely resemble vertebrate monocytes/macrophages and granulocytes.

Strikingly, several transcription factors that are important for hematopoiesis and immunity in vertebrates have been shown to play similar roles in *Drosophila*. First, members of the GATA family are recurrently used during hematopoiesis. For instance, in vertebrates, GATA2 plays a critical role in the proliferation and/or survival of hematopoietic stem cells and controls the production of mast cells (Tsai and Orkin, 1997). Moreover, while GATA2 is downregulated to permit erythrocytic differentiation (Persons *et al.*, 1999), GATA1 is necessary for the differentiation of erythrocytes and megakaryocytes (Pevny *et al.*, 1991; Fujiwara *et al.*, 1996). In *Drosophila*, the only GATA factor known to participate in hematopoiesis is encoded by the gene *serpent* (*srp*) (Rehorn *et al.*, 1996) that is alternatively spliced to give rise to different isoforms containing either one (SrpC) or two (SrpNC) GATA zinc fingers (Waltzer *et al.*, 2002). Similarly to GATA2, *srp* is expressed in the blood cell precursors and is required for the proliferation and maintenance of this population (Rehorn *et al.*, 1996; Sam *et al.*, 1996). However, *srp* may also have a function later in hematopoiesis as Srp is still detected in mature plasmatocytes and crystal cells (Lebestky *et al.*, 2000). Secondly, members of the friend of GATA (FOG) family are implicated in hematopoietic development in both mammals and *Drosophila*. FOG proteins interact with the N-terminal zinc finger of GATA factors and modulate their activity (Haenlin *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 1997). In mouse, the interaction between FOG1 and GATA1 is necessary for normal erythroid and megakaryocytic differentiation (Tsang *et al.*, 1998). In *Drosophila*, the FOG factor U-shaped (Ush) represses crystal cell fate (Fossett *et al.*, 2001) and inhibits the expression of the apoptotic body receptor *croquemort* (*crq*) in plasmatocytes, most likely by interacting with SrpNC (Waltzer *et al.*, 2002). Thirdly, factors containing a Runt domain (hereafter collectively called RUNX factors) participate in hematopoiesis in both vertebrates and *Drosophila*. In mouse, RUNX1, also known as acute myeloid leukemia factor 1 (AML1), is required for the emergence of definitive hematopoietic stem cells (Okuda *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). In addition, RUNX1 may promote myeloid progenitor differentiation, as suggested by *in vitro* assays and the frequent chromosomal translocations affecting RUNX1 that are associated with human acute myeloid leukemia (Speck and Gilliland, 2002). In *Drosophila*, Lozenge (Lz), which exhibits 71% identity with RUNX1 in the Runt domain, also plays a role in

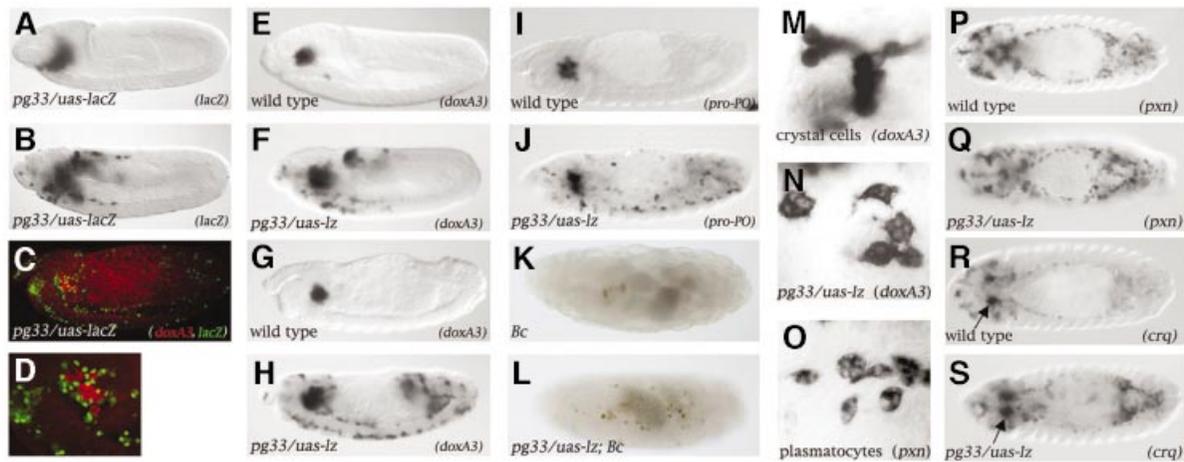


Fig. 1. Lz can induce the crystal-cell-specific genetic program in plasmatocytes. (A–D) The Gal4 line *pg33* drives expression in the plasmatocytes. Side views of (A) *pg33/uas-lacZ* stage 9, (B) *pg33/uas-lacZ* stage 11 and (C) *pg33/uas-lacZ* stage 14 embryos processed to reveal *lacZ* expression (A and B) or *doxA3* mRNA (red) and nuclear-LacZ (green) (C). (D) Higher magnification of the head region in (C). (E–L) *pg33*-driven expression of Lz induces the ectopic expression of the crystal cell marker *doxA3* and *pro-PO* in plasmatocytes as well as their melanization in a *Bc* mutant context. (E–H) Side views of wild-type (E, G and I) or *pg33/uas-lz* (F, H and J) embryos; *doxA3* expression at stage 11 (E and F) or stage 14 (G and H); *pro-PO* expression at stage 14 (I and J). Side views of *Bc* (K) or *pg33/uas-lz; Bc* (L) stage 17 embryos. (M–S) Lz does not repress plasmatocyte cell fate. (M) High magnification of the head region around the proventriculus showing wild-type stage 15 crystal cells expressing *doxA3*. (N) High magnification of cells ectopically expressing *doxA3* in a *pg33-gal4/uas-lz* stage 15 embryo (localized ventrally in the trunk). (O) High magnification of wild-type stage 15 plasmatocytes expressing *pxn* (localized ventrally in the trunk). (P–S) Dorsal views of wild-type (P and R) or *pg33/uas-lz* (Q and S) stage 14 embryos: (P and Q) *pxn* expression; (R and S) *crq* expression. The arrows in R and S indicate crystal cells expressing *crq*.

hematopoiesis (Lebestky *et al.*, 2000). Indeed, *lz* expression initiates in a small fraction of *srp*-expressing hemocytes in response to Notch signaling and is necessary for crystal cell production (Lebestky *et al.*, 2000, 2003). Taken together, the functional conservation of the GATA, FOG and RUNX proteins in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis suggests that aspects of the molecular circuitry that control blood cell development might also be conserved.

Recent genetic studies suggest that *Drosophila* hematopoiesis is organized in a hierarchical cascade of transcription factors controlling progenitor differentiation into the two major cell types: plasmatocytes and crystal cells. Thus *srp* expression in prohemocytes is essential for the expression of the transcription factors *glial cell missing* (*gcm*) and *gcm2* (Bernardoni *et al.*, 1997; Alfonso and Jones, 2002), *lz* (Lebestky *et al.*, 2000) and *ush* (Fossett *et al.*, 2001). Subsequently, while *gcm* and *gcm2* are required for hemocyte differentiation into mature plasmatocytes, *lz* is required for crystal cell determination. Interestingly, this hierarchical cascade is not absolutely linear, as the conserved GATA/FOG interaction provides a feedback loop by which Ush impinges on *srp* function by interacting with SrpNC (Waltzer *et al.*, 2002). Whether other players in this cascade interact with each other is not known.

Here we investigate the function and mechanism of action of the RUNX factor Lz during blood cell formation in *Drosophila*. We show that Lz cooperates with Srp to induce crystal cell differentiation *in vivo*. Our data suggest that this cooperation is mediated by the formation of an Srp/Lz complex that synergistically activates transcription. Consistent with this, we find that Srp and Lz interact through their conserved GATA zinc finger and Runt domain, respectively, and that this interaction is conserved through evolution as mouse GATA1 and RUNX1 can

interact with each other and with their *Drosophila* counterparts. Finally, we show that GATA and RUNX factors can synergize to activate transcription in cell culture. Together, these results suggest that the interaction and cooperation between GATA and RUNX factors may play an important role during hematopoiesis from *Drosophila* to vertebrates.

Results

lozenge can induce crystal-cell-specific gene expression

The choice between crystal cell and plasmatocyte differentiation appears to be regulated mainly by the antagonistic action of Gcm on Lz. Notably, it was shown that forced expression of *gcm* in crystal cell precursors redirects their fate toward a plasmatocyte destiny (Lebestky *et al.* 2000). To gain further insight into the mechanisms controlling the choice between plasmatocyte and crystal cell formation, we asked whether *lz* is sufficient to impose the crystal cell fate. Normally, Lz expression is activated in a small subset of hemocytes that will give rise to crystal cells but is absent from the vast majority of plasmatocyte-forming hemocytes (Lebestky *et al.*, 2000). We used the UAS/GAL4 system to express Lz ectopically in plasmatocytes to see whether they would be converted into crystal cells. The Gal4 driver line *pg33* contains a P(Gal4) insertion upstream of *silver*, a gene with no known function in hematopoiesis (Bourbon *et al.*, 2002). This line drives specific expression of a *uas-lacZ* reporter gene in plasmatocytes from stage 9 onward (Figure 1 A–D and Supplementary figure 1 available at *The EMBO Journal* Online). Note that no LacZ expression is detected in crystal cells (Figure 1C and D). To monitor crystal cell formation, we analyzed the expression of an early crystal-cell-specific marker, the monophenol mono-oxygenase

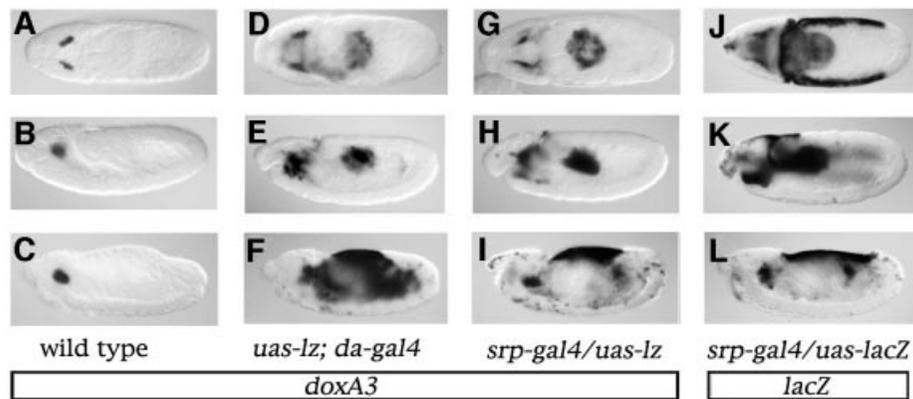


Fig. 2. Lz-mediated activation of crystal-cell-specific genes is restricted to *srp*-expressing cells. (A–I) Side views of *doxA3* expression in stage 9 (A, D and G), stage 11 (B, E and H) or stage 14 (C, F and I) embryos: (A–C) wild-type; (D–F) *uas-lz; da-gal4*; (G–I) *srp-gal4/uas-lz*. (J–L) Side views of *lacZ* expression in *srp-gal4/uas-lacZ* stage 9 (J), stage 11 (K) or stage 14 (L) embryos.

DoxA3 that is expressed as early as stage 9 (see Supplementary figure 1), as well as that of the mature crystal-cell-specific marker prophenoloxidase (Pro-PO), an enzyme of the melanization cascade that can be detected from stage 11 onward (Waltzer et al., 2002). Upon *pg33*-driven expression of Lz in plasmatocytes, we observed ectopic expression of *doxA3* in cells that migrated along the normal plasmatocyte migration paths (compare Figure 1F with E and B). At the end of embryogenesis, *doxA3*-expressing cells were scattered throughout the embryo (compare Figure 1H with G). *pg33/uas-lz* induced ectopic *pro-PO* expressing cells along a similar pattern (compare Figure 1J with I). Crystal cells can also be visualized by using the *Black cell (Bc)* mutation, which causes premature melanization within the cell. When this mutation was introduced into a *pg33/uas-lz* context, we observed ectopic melanized cells dispersed throughout the embryo by the end of embryogenesis (compare Figure 1L with K). However, hemocytes ectopically expressing Lz morphologically resembled mature plasmatocytes rather than crystal cells (compare Figure 1N with O and M, respectively). Consistent with their morphology, hemocytes ectopically expressing Lz expressed the plasmatocyte markers *peroxidase (pxn)* (Nelson et al. 1994) and *croquemort (crq)* in a normal pattern (Franc et al., 1996) (compare Figure 1Q and S with P and R, respectively). Thus Lz does not seem to repress plasmatocyte differentiation. Note that the plasmatocyte cell fate was not overridden by Lz even when Lz was misexpressed precociously throughout the mesoderm using the *twist-gal4* driver (Supplementary figure 2).

Taken together, these results indicate that Lz can induce in plasmatocytes features specific of crystal cells, namely the expression of genes specific to this lineage as well as the enzymatic cascade required for melanization.

***srp* is required for Lz-mediated activation of crystal-cell-specific genes**

In order to test whether Lz could also induce expression of crystal-cell-specific genes in non-hemogenic territories, we misexpressed Lz throughout the embryo using the *da-gal4* driver and analyzed *pro-PO* and *doxA3* expression. As early as stage 9, we detected ectopic expression of *doxA3* in the hematopoietic primordium as well as in the

posterior midgut (compare Figure 2D with A). At later stages, *doxA3* could still be detected in hemocytes and in the posterior midgut as well as in the fat body (a lateral derivative of the mesoderm) and in the amnioserosa (compare Figure 2E and F with B and C). Similar results were obtained when we analyzed *pro-PO* expression (Supplementary figure 3). Thus, the activation of crystal cell markers expression in response to Lz is spatially restricted.

Interestingly, all the tissues that responded to Lz also express the GATA factor Srp (Sam et al., 1996). To substantiate this observation, we ectopically expressed Lz under the control of an *srp-gal4* driver that recapitulates most of the embryonic expression of *srp* except that in the fat body. As shown in Figure 2G–L, there was a striking correlation between the pattern of expression of a *lacZ* reporter gene placed under the control of *srp-gal4* and the *doxA3* expression pattern when Lz was ectopically expressed with the same driver or with *da-gal4* (compare Figure 2J, K and L with G, H and I or D, E and F, respectively). Note that ectopic induction of *doxA3* expression was delayed compared with *lacZ*, particularly in the amnioserosa. These results show that Lz-induced activation of the crystal cell program is restricted to *srp*-expressing cells and that all the *srp*-expressing cells can activate this program in the presence of Lz.

The above results suggest that *srp* might be required for Lz-induced gene expression. In order to test this hypothesis, we expressed Lz in an *srp*-mutant background. Expression of the Lz transgene was visualized by *in situ* hybridization with a probe against *lz* and we monitored crystal cell differentiation with a probe against *doxA3*. As expected, expression of neither *doxA3* nor *lz* was detected in an *srp* null mutant (*srp^{6G}*) (compare Figure 3D with A). Consistent with the above results, when Lz was expressed throughout the mesoderm using the *twist-gal4* driver in a wild-type embryo, ectopic expression of *doxA3* was detected in the anterior mesoderm and posterior midgut by stage 11 (Figure 3F) as well as in the fat body by stage 14 (Figure 3B). In contrast, no *doxA3* expression was observed in an *srp^{6G}* mutant when Lz was expressed in the mesoderm (Figure 3C). To investigate further the need for *srp*, we then made use of the *srp³* allele in which hemocyte precursors appear to form (Sam et al., 1996; Fossett et al.,

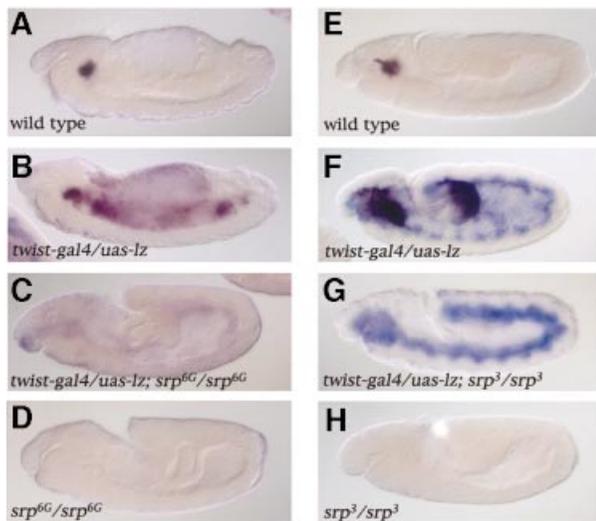


Fig. 3. *srp* is required for *lz*-mediated activation of crystal-cell-specific genes. Side views of *doxA3* (dark purple) and *lz* (blue staining) expression in stage 14 (A–D) or stage 11 (E–H) embryos: (A and E) wild-type; (B and F) *twist-gal4/uas-lz*; (C) *twist-gal4/uas-lz; srp^{6G}/srp^{6G}*; (D) *srp^{6G}/srp^{6G}*; (G) *twist-gal4/uas-lz; srp³/srp³*; (H) *srp³/srp³*.

2001). In this mutant, neither *doxA3* nor *lz* were expressed (compare Figure 3H with E). As for *srp^{6G}*, *twist*-driven expression of *Lz* was unable to induce *doxA3* expression in an *srp³* mutant (compare Figure 3G with F). These results indicate that *srp* is required for *lz*-induced crystal-cell-specific gene expression.

Lz and Srp interact through a conserved domain

Although it is possible that *Lz* requires a cofactor induced by *srp* expression, we favored the hypothesis that *Lz* directly interacts with *Srp*. Accordingly, we looked for physical interaction between *Srp* and *Lz* using a pulldown assay *in vitro*. We found that *in vitro* translated [³⁵S]methionine-labeled *SrpC* and *SrpNC* bound to GST-*Lz* but not to GST alone (Figure 4A). Reciprocally, we observed that *in vitro* translated *Lz* bound to GST-*SrpC* but not to GST alone (Figure 4B). To characterize the mutual binding domains within *Lz* and *Srp*, we expressed various truncated versions of these proteins either as GST fusions or as *in vitro* translated proteins. As shown in Figure 4A, the GATA zinc finger of *SrpC* (amino acids 478–533) is required for the interaction with GST-*Lz*. Moreover, the Runt domain of *Lz* (amino acids 276–407) is required and sufficient for the interaction with GST-*SrpC* (Figure 4B). These experiments demonstrate that *Lz* and *Srp* bind directly to each other through the RUNT domain and the GATA zinc finger, respectively. Given that these domains are highly conserved in their vertebrate counterparts, we tested the binding of mouse *GATA1* to *Lz* and of mouse *RUNX-1* to *Srp*. As shown in Figure 4C (left panel), *in vitro* translated *GATA1* specifically interacted with the *Lz* Runt domain. Similarly, *RUNX1* bound to GST-*SrpC* (Figure 4C, right panel). Thus the GATA–*RUNX* interaction is conserved between species.

While this article was in preparation, Elagib *et al.* (2003) reported that *RUNX1* interacts with *GATA1*. Using immunoprecipitations, these authors showed that the N-terminal domain of *GATA-1*, which is not conserved

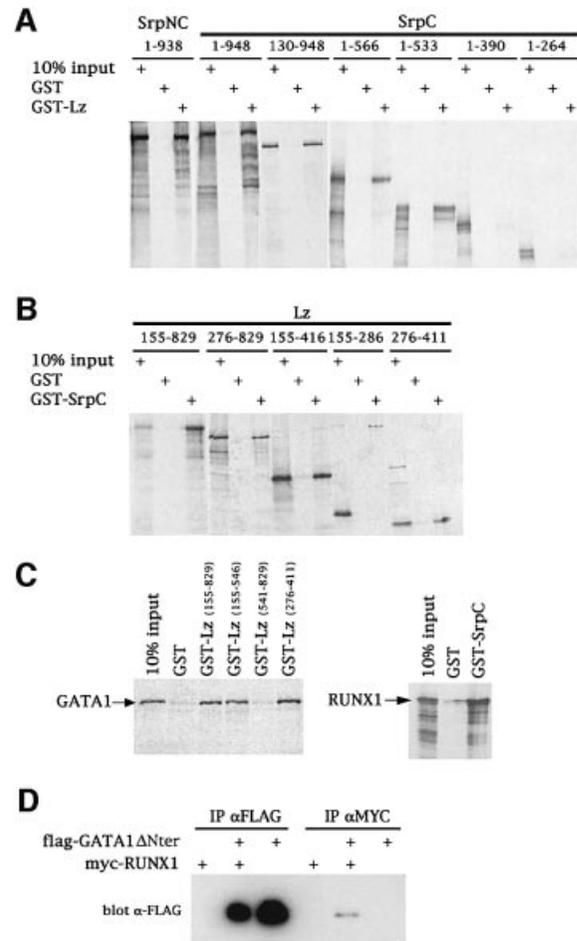


Fig. 4. GATA and *RUNX* factors interact through their conserved Runt and GATA zinc finger domains. (A and B) Characterization of the interaction between *Srp* and *Lz* by pulldown assays. Equivalent molar amounts of the GST fusion proteins were tested for their interaction with the various *in vitro* translated [³⁵S]methionine-labeled protein fragments as indicated. (C) The GATA–*RUNX* interaction is conserved across species. Pulldown assays between *in vitro* translated mouse *GATA1* and various GST-*Lz* domains (left panel) or between *in vitro* translated mouse *RUNX1* and GST-*SrpC* (right panel). (D) *RUNX1* and *GATA1* deleted of its N-terminal domain interact *in vivo*. COS-7 cells were transfected with pCDNA-myc-*RUNX1* and pCDNA-flag-*GATA1*ΔNter as indicated in the upper part of the panel. Cell extracts were immunoprecipitated (IP) using either anti-flag or anti-myc and immunoblotted with anti-flag.

between species, was required for the interaction. On the contrary, our results show that GATA factors interact with *RUNX* proteins through their conserved zinc fingers. In order to clarify this point, we performed immunoprecipitation with *GATA1* and *RUNX1*. As shown in Figure 4D, a flag-tagged version of N-terminally deleted *GATA1* expressed in COS-7 cells was specifically co-immunoprecipitated with myc-tagged *RUNX1*. This result lends further support to our conclusion that GATA and *RUNX* proteins interact together and that the interaction is mediated through their conserved GATA zinc finger and Runt domain, respectively.

GATA1 and Srp synergize with RUNX1 to activate transcription in vitro

To determine the functional consequences of the GATA–*RUNX* interaction, we first analyzed the effect of *RUNX1*

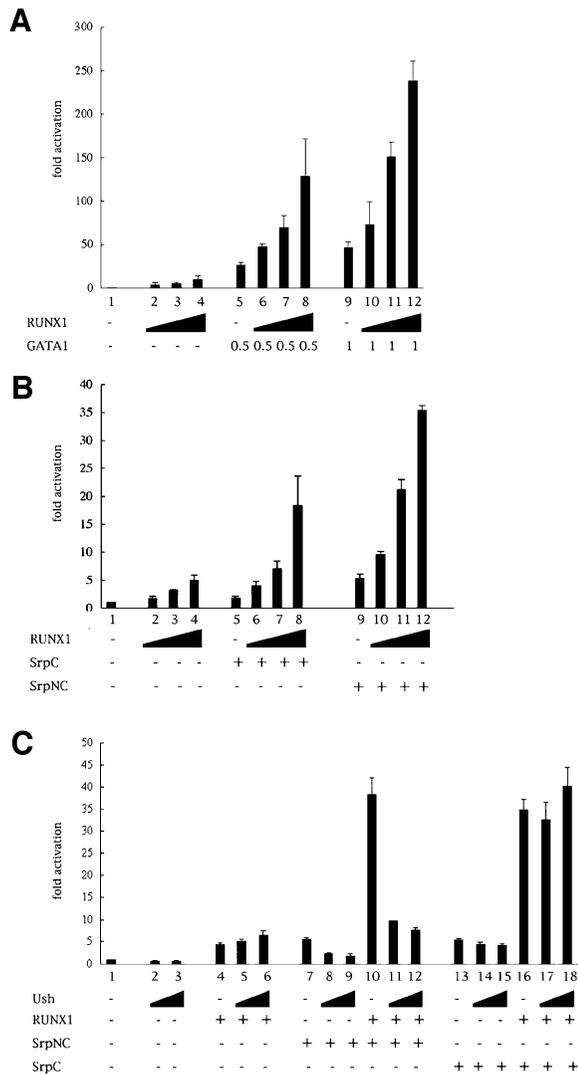


Fig. 5. GATA and RUNX synergize to induce transcription from a GATA-responsive promoter. Luciferase activities of the GATA reporter pGATA-luc in transfected COS-7 cells in the presence of different combination of expression vectors for GATA1, RUNX1, SrpC, SrpNC and Ush. Results are expressed as fold activation relative to empty expression vector. (A) RUNX1 synergizes with GATA1 to activate the GATA reporter gene. (B) RUNX1 synergizes with SrpC and SrpNC to activate the GATA reporter gene (C) Ush antagonizes SrpNC- but not SrpC-mediated transactivation and cooperation with RUNX1.

on GATA1-mediated transactivation. We transfected COS-7 cells with a reporter plasmid containing the luciferase reporter gene placed under the control of nine GATA binding sites linked to a minimal promoter (Newton *et al.*, 2001). Upon expression of GATA1, we observed a strong activation of the reporter gene (Figure 5A, lanes 5 and 9). Unexpectedly, RUNX1 weakly activated this reporter gene (Figure 5A, lanes 2–4). Interestingly, when we coexpressed GATA1 with increasing amounts of RUNX1, we observed a dose-dependent synergistic transactivation of the reporter gene (Figure 5A, lanes 6–8 and 10–12). This cooperation was not observed in the absence of the GATA binding site upstream of the reporter gene (data not shown). We then assessed Srp transactivation potential in this heterologous assay. Expression of SrpC or SrpNC modestly, but reproducibly,

activated the expression of the reporter gene (Figure 5B, lanes 5 and 9). This activation was dependent on the presence of GATA binding sites upstream of the reporter gene (data not shown). Remarkably, in the presence of increasing amounts of RUNX1, SrpNC and SrpC induced a robust transactivation (Figure 5B, lanes 6–8 and 10–12) that was up to 2-fold greater than the sum of the activation induced by each factor on its own. Thus, like GATA1, Srp can interact and synergize with RUNX1 to induce transcription *in vitro*. On the contrary, despite Lz interacted with Srp and GATA1, it could not substitute for RUNX1 in this transactivation assay (data not shown). It is possible that Lz does not function normally in this heterologous system. Notably the temperature of 37°C may be detrimental to Lz function as suggested by the existence of a temperature-sensitive allele of *lz*.

Members of the FOG family interact with the GATA N-terminal zinc finger and can either repress or enhance GATA-mediated activation (Haenlin *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 1997). In *Drosophila*, the FOG factor Ush interacts with SrpNC and represses crystal cell formation as well as *crq* expression (Fossett *et al.*, 2001; Waltzer *et al.*, 2002). We decided to test the effect of Ush on Srp- and on Srp/RUNX1-mediated activation. As shown in Figure 5C, Ush repressed SrpNC-mediated transactivation (lanes 8 and 9 compared with lane 7). Moreover, the transactivation observed in the presence of both RUNX1 and SrpNC was strongly repressed by Ush (lanes 11 and 12 compared with lane 10). This repression is specific to the interaction between Ush and SrpNC since it is not observed in the case of SrpC- or SrpC/RUNX1-mediated transactivation (compare lanes 14 and 15 with lane 13, and lanes 17 and 18 with lane 16, respectively). Taken together, these data show that the interaction of SrpNC with Ush inhibits SrpNC-induced activation and impedes the cooperation between SrpNC and RUNX1. These results are consistent with previous genetic studies showing that Ush inhibits crystal cell formation (Fossett *et al.*, 2001) and SrpNC-induced activation of *crq* (Waltzer *et al.*, 2002).

lz* and *srp* synergize to induce crystal-cell-specific gene activation *in vivo

Next we evaluated whether GATA and RUNX factors can cooperate *in vivo* during *Drosophila* blood cell development. We have shown previously that *twist*-driven misexpression of *srp* can induce the expression of plasmatocyte-specific genes in most of the mesoderm. In contrast, ectopic *pro-PO* activation was restricted to the head mesoderm (Waltzer *et al.*, 2002). Our present results indicate that Lz can induce the crystal-cell-specific program only in *srp*-expressing cells. We surmised that Lz and Srp might cooperate to induce crystal-cell-specific gene expression. In order to test this hypothesis, we coexpressed Lz with SrpC or SrpNC in the mesoderm and we monitored the expression of crystal-cell-specific genes. Whereas Lz, SrpC or SrpNC alone induced restricted ectopic activation of *doxA3* (Figure 6B, C and E compared with A, respectively), the coexpression of SrpC or SrpNC with Lz had dramatic consequences: not only did we observe expression of *doxA3* throughout the mesoderm, but its expression was also much stronger (Figure 6D and F). We observed similar results when we assessed *pro-PO* expression (Supplementary figure 3) or the expression of

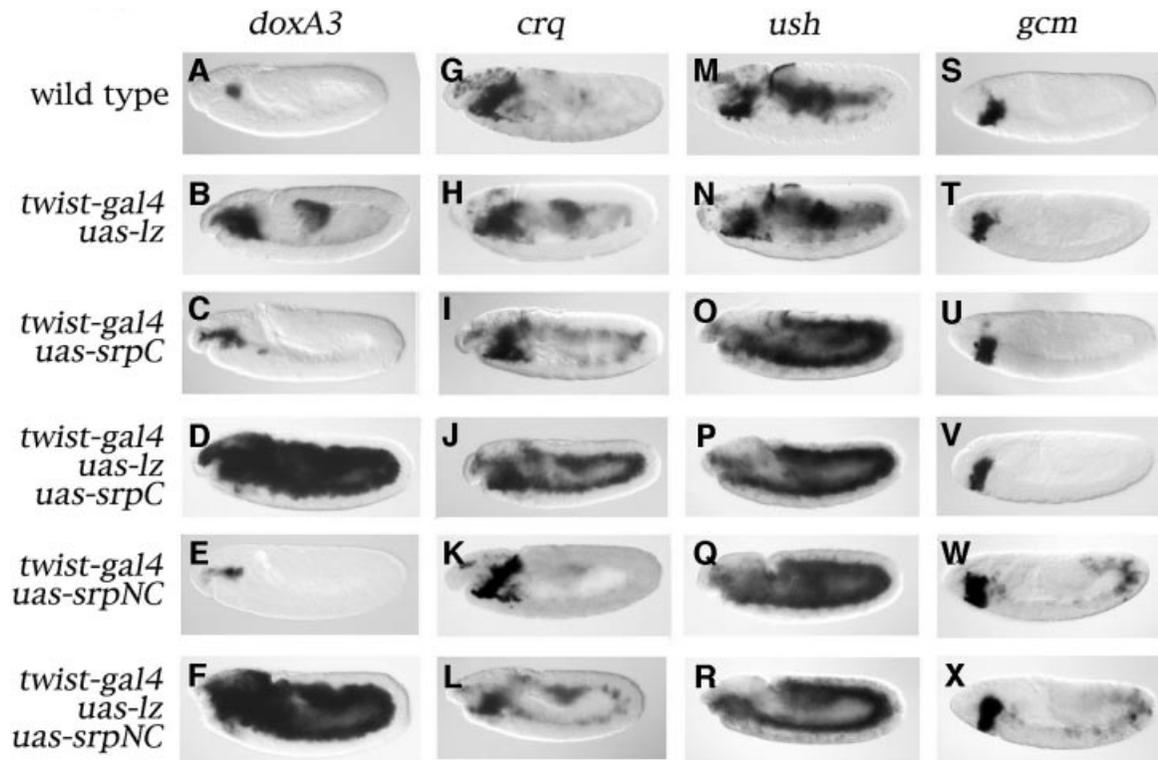


Fig. 6. Srp and Lz cooperate to induce crystal-cell-specific genes *in vivo*. Side views of stage 11 (A–R) or stage 8 (S–X) embryos processed to reveal the expression of *doxA3* (A–F), *crq* (G–L), *ush* (M–R) or *gcm* (S–X). (A, G, M and S) wild-type. (B, H, N and T) *twist-gal4/uas-lz*. (C, I, O and U) *twist-gal4; uas-srpC*. (D, J, P and V) *twist-gal4/uas-lz; uas-srpC*. (E, K, Q and W) *twist-gal4; uas-srpNC*. (F, L, R and X) *twist-gal4/uas-lz; uas-srpNC*.

two other crystal cell markers, CG1633 and CG8193 (L. Waltzer, unpublished results). These data indicate that Srp cooperates with Lz to induce the activation of the crystal-cell-specific program.

As mentioned above, *srp* can induce ectopic activation of various genes implicated in hematopoiesis. Among them, *crq* can be activated ectopically by SrpC but not by SrpNC, owing to the inhibitory action of Ush (Waltzer *et al.*, 2002). Moreover, although *crq* was thought to be specifically expressed in plasmatocytes, we have observed that it is also expressed in crystal cells. Indeed, the main site of expression of *crq* in stage 14/15 embryos is a bilateral cluster of cells next to the proventriculus (Figure 1R, arrow) that also express *doxA3* and are absent in an *lz* mutant (Supplementary figure 1). Thus, at least at the RNA level, *crq* is expressed in both plasmatocytes and crystal cells during late embryogenesis. This suggests that SrpC and Lz may also cooperate to induce *crq* expression as they do to induce crystal-cell-specific genes. Accordingly, when Lz was coexpressed with SrpC, we observed a strong increase in the level of *crq* expression throughout the mesoderm compared with the activation induced by Srp or Lz alone (compare Figure 6J with I and H). However, when Lz was coexpressed with SrpNC, a modest ectopic activation of *crq* throughout the mesoderm was observed (Figure 6L). Since we have shown previously that SrpNC alone does not induce ectopic expression of *crq* owing to the inhibitory effect of Ush (Waltzer *et al.*, 2002), these results, as well as those of our transactivation assays, suggest that the balance between

Ush and Lz can modulate the transcriptional response to SrpNC *in vivo*.

We also assessed the expression of *ush* and *gcm*, two genes whose expression is initiated in the hematopoietic primordium and is maintained specifically in plasmatocytes (Lebestky *et al.*, 2000; Fossett *et al.*, 2001). *ush* can be activated throughout the mesoderm in response to SrpC or SrpNC, whereas *gcm* is only activated by SrpNC (Waltzer *et al.*, 2002). Interestingly, when Lz was coexpressed with SrpC or SrpNC, Srp-induced activation of *ush* did not seem to be either enhanced or repressed (compare Figure 6P and R with O and Q). Similarly, SrpNC-induced ectopic activation of *gcm* was not affected by the coexpression of Lz, and SrpC could not ectopically activate *gcm* expression even in the presence of Lz (compare Figure 6W with X and U with V). Thus Lz does not cooperate with Srp to induce *ush* or *gcm*, two known antagonists of crystal cell development.

In conclusion, Srp and Lz seem to cooperate only in the activation of genes expressed in crystal cells. This suggests that the Srp/Lz complex provides the molecular selectivity to trigger crystal cell differentiation during hematopoiesis.

***srp* and *lz* cooperate to induce crystal cell formation**

All the results shown here support the hypothesis that Lz and Srp act in concert to induce crystal cell development. In apparent contradiction, we have previously shown that *lz*-driven expression of Srp in crystal cell precursors inhibits their differentiation (Waltzer *et al.*, 2002).

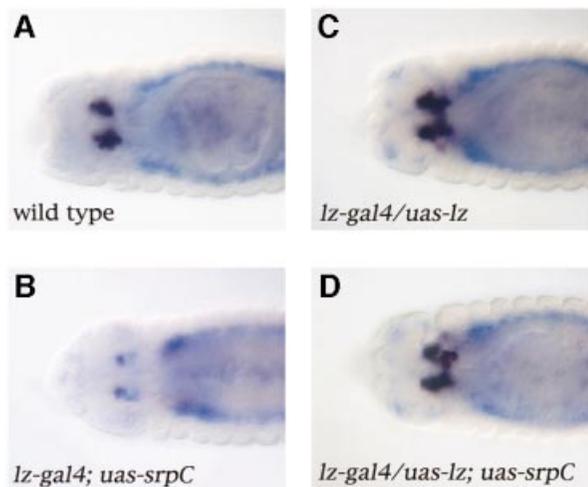


Fig. 7. The balance between Srp and Lz is critical for crystal cell formation. Dorsal view of stage 14 embryos processed to reveal *doxA3* expression (black staining) and *srp* expression (blue staining): (A) wild-type; (B) *lz-gal4; uas-srpC*; (C) *lz-gal4/uas-lz*; (D) *lz-gal4/uas-lz; uas-srpC*.

Intriguingly, Srp expression in crystal cells is lower than in plasmatocytes (Lebestky *et al.*, 2000), suggesting that the downregulation of Srp in these cells is important for their differentiation. Moreover, by overexpressing *srp* in crystal cell precursors, we altered the stoichiometry of Srp versus Lz. We hypothesized that increasing the dose of Lz might revert the *srp* gain-of-function phenotype. Accordingly, we used the *lz-gal4* driver to express *uas-srpC* and/or *uas-lz* in crystal cell progenitors and we monitored crystal cell differentiation by assessing *doxA3* expression. As shown in Figure 7, overexpression of Lz did not seem to affect crystal cell determination (compare Figure 7C with A). On the contrary, SrpC reduced the number of crystal cells and repressed their differentiation, judging by the repression of *doxA3* expression (compare Figure 7B with A). However, when Lz was coexpressed with SrpC, formation and differentiation of the crystal cells were restored (Figure 7D). Similar results were obtained with SrpNC or when we assessed *pro-PO* expression (not shown). Thus the relative levels of Srp and Lz are important for crystal cell development and these two factors cooperate to induce their formation *in vivo*.

Discussion

In *Drosophila*, as in vertebrates, members of the GATA and RUNX families play critical roles during hematopoiesis. In this study, we have investigated the mechanisms by which the RUNX factor Lz controls the formation of crystal cells, one of the two embryonic types of blood cell in *Drosophila*. We provide evidence that Lz interacts and cooperates with the GATA factor Srp during this process and that this interaction is conserved through evolution.

Lz induces the crystal cell genetic program

In the embryo, *Drosophila* blood cell progenitors can differentiate into two cell types: plasmatocytes or crystal cells. Crystal cell precursors are first detectable as a small fraction of hemocytes in which Lz is expressed. Whereas

Lz function is continuously required for crystal cell development, its mode of action in this process was unknown (Lebestky *et al.*, 2000). Our results provide strong evidence that Lz can trigger the genetic program necessary for crystal cell function as its misexpression in plasmatocytes induced the ectopic expression of crystal-cell-specific genes in these cells and their melanization in a *Bc* mutant context. Contrary to our findings, Lebestky and coworkers failed to observe induction of the crystal cell fate when Lz was overexpressed under the control of a heat-shock promoter (Lebestky *et al.*, 2000). This difference may be due to the marker they analyzed and/or the method of misexpression used.

It is worth noting that the plasmatocyte cell fate does not seem to be repressed upon ectopic Lz expression. Several factors expressed in plasmatocytes may prevent Lz from repressing their differentiation along this path. For instance *srp*, *gcm* and *ush* are expressed at high levels in pro-hemocytes and in plasmatocytes, while they are normally downregulated (*srp*) or not expressed (*gcm* and *ush*) in crystal cells (Lebestky *et al.*, 2000; Fossett *et al.*, 2001). Upon ectopic expression of *lz* in plasmatocytes, the expression of these genes was not repressed and thus they might still promote plasmatocyte differentiation. In addition, contrary to crystal cells, plasmatocytes are migratory cells that will be exposed to changing environmental cues; thus their cellular identity must be maintained cell autonomously and may be locked in place early on. Hence the concomitant upregulation of Lz and repression of *ush* and *gcm* in crystal cell progenitors is probably a critical step for normal blood cell differentiation.

Srp and Lz cooperate to induce crystal cell fate

Our results indicate that Srp and Lz act in concert to induce crystal cell development. We demonstrate that the induction of crystal-cell-specific genes by Lz is strictly dependent on the presence of Srp. Moreover, we show that Lz and Srp bind to each other and that Srp synergized with RUNX1 to induce transcription in cell culture. Taken together, these lines of evidence suggest that Srp and Lz form a complex that activates the transcription of the genes required for crystal cell differentiation *in vivo*.

Interestingly, the transcriptional cooperation between Srp and Lz seems restricted to genes expressed in crystal cells, such as *doxA3*, *pro-PO* and *crq*. How this target gene specificity is achieved is not known. In cell culture, Srp can cooperate with RUNX1 to activate transcription from a synthetic promoter containing multimerized GATA binding sites. However, *in vivo*, while Srp alone activates the expression of *crq*, *gcm* and *ush*, cooperation between Srp and Lz was not observed in expression of *gcm* and *ush*, two genes that antagonize crystal cell formation. The Srp/Lz complex may only bind to promoters containing certain GATA binding sites. Alternatively, it is possible that Lz also participates in the tethering of the Srp/Lz complex to RUNX binding sites. In order to bind these sites, RUNX proteins have to form dimers with CBF β . In *Drosophila*, the CBF β homologs Brother and Big Brother are ubiquitously expressed during embryogenesis, but it is not known whether they play a role in hematopoiesis (Golling *et al.*, 1996; Kaminker *et al.*, 2001). Interestingly, *doxA3* and *pro-PO* proximal promoter regions contain both GATA and RUNX consensus binding sites, which

suggests that both partners may participate in the recruitment (L. Waltzer, unpublished observation). Defining the *cis*-responsive elements in crystal-cell- and plasmacyte-specific genes, respectively, should help to define the molecular mechanisms of cooperation between Srp and Lz.

Our finding that Srp plays a direct part in crystal cell differentiation was unexpected as forced expression of Srp in these cells inhibited their development, suggesting that *srp* has to be downregulated to allow their differentiation (Waltzer *et al.*, 2002; Evans and Banerjee, 2003). Instead, we propose that Srp is necessary early on for all hemocyte fate (including that of crystal cell precursors) and subsequently, in balance with Lz, for crystal cell differentiation. A similar situation has been described for GATA2 which is required at a high level for proliferation of blood cell progenitors and at a lower level in differentiated blood cells, such as mature erythrocytes and mast cells (Jippo *et al.*, 1996; Harigae *et al.*, 1998; Tsai and Orkin, 1997). Our study suggests that the balance between Srp and Lz, rather than the absolute level of Srp, may be critical for crystal cell differentiation. Indeed, the inhibition of crystal cell formation due to the overexpression of Srp was counterbalanced by increasing the levels of Lz. The fact that Srp is required even at stages when its overexpression can be inhibitory highlights that Srp function at a given moment is dependent on its precise level of expression. It also probably reflects the existence of cross-regulation between a combination of transcription factors whose equilibrium in the progenitors is critical for cell fate choice.

Cross-regulations between Ush, Lz and Srp

An important component of this equilibrium is the FOG factor Ush. Members of the FOG family interact specifically with GATA N-terminal zinc fingers and act either as coactivators or corepressors (Haenlin *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002). As such, Ush can only interact with SrpNC, and not with SrpC, and we have previously proposed that Ush controls hematopoiesis by repressing SrpNC-mediated activation (Waltzer *et al.*, 2002). Our present data support this hypothesis since Ush directly repressed SrpNC-mediated activation in our transactivation assay. During hematopoiesis, Ush was shown to repress crystal cell formation (Fossett *et al.*, 2001). Consistent with this role, we observed that Ush inhibits the transactivation mediated by the SrpNC/RUNX complex. Conversely, the inhibitory effect of Ush on SrpNC-induced activation of *crq* can be partially relieved by Lz *in vivo*. Since Ush is coexpressed with Srp and Lz in crystal cell precursors (Fossett *et al.*, 2001), a competition between Ush and Lz to modulate SrpNC activity might influence cell fate choice. Indeed, Lebestky and coworkers observed that a small fraction of the Lz-expressing cells differentiate into plasmacytes (Lebestky *et al.*, 2000). We propose that the cross-interactions between Srp, Lz and Ush might constitute a mechanism whereby one cell type is chosen at the expense of the other. Similar regulation of GATA activity occurs during chicken eosinophil differentiation. Eosinophil progenitors express GATA1, FOG1 and C/EBP. FOG1 was shown to repress the expression of eosinophil-specific markers by blocking GATA-induced transactivation, while C/EBP interacts and cooperates with GATA1 to induce eosinophil differentiation (Yamaguchi *et al.*, 1999; Querfurth *et al.*, 2000).

Thus dose-dependent antagonistic or cooperative interactions between GATA factors and their partners appear to be a conserved means of regulating lineage choice and differentiation.

Conserved interaction and cooperation between GATA and RUNX

We have shown here that GATA and RUNX factors cooperate *in vivo* to control *Drosophila* blood cell formation. Several lines of evidence suggest that the functional relationship between GATA and RUNX factors may be conserved in vertebrate hematopoiesis. First, we have shown that the interaction between Srp and Lz occurs through highly conserved domains. Secondly, we have found that GATA1 binds to Lz and that RUNX1 interacts with Srp. Thirdly, in cotransfection assays, we have demonstrated that RUNX1 and GATA1 bind to each other and synergistically activate transcription. Elagib and coworkers have also recently described RUNX1 binding to GATA1 (Elagib *et al.*, 2003). Contrary to what we observed, these authors failed to detect an interaction with RUNX1 when GATA1 N-terminal transactivation domain was deleted. The reason for this discrepancy is unclear. Interestingly though, they showed that these two factors cooperate to induce the expression of megakaryocyte-specific integrin *in vitro*, suggesting that RUNX1 may participate with GATA1 to induce megakaryocytic differentiation. Moreover, haploinsufficient mutations in RUNX1 are associated with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD/AML) (Song *et al.*, 1999; Michaud *et al.*, 2002), suggesting a role for RUNX1 in human megakaryopoiesis. While it is well established that GATA1 is required for normal megakaryopoiesis (Vyas *et al.*, 1999), a role for RUNX1 in this process has not yet been demonstrated. Furthermore, acquired mutations in GATA1 are specifically associated with megakaryocytic leukemia and transient myeloproliferative disorder in children with Down syndrome (Wechsler *et al.*, 2002; Groet *et al.*, 2003). As RUNX1 is located on chromosome 21, it is tempting to speculate that the interaction between GATA1 and RUNX1 may participate in the development of these megakaryocytes. Finally, RUNX1 is coexpressed with GATA1, GATA2 or GATA3 at different stages of hematopoiesis (Speck and Gilliland, 2002). Thus the GATA/RUNX complex may regulate various aspects of hematopoiesis from stem cell emergence and proliferation to lineage determination and terminal differentiation.

In conclusion, our results show for the first time that the GATA and RUNX factors cooperate *in vivo* to control hematopoiesis. In *Drosophila*, the cooperation between Srp and Lz is central to the specification of crystal cell fate. We have also highlighted the fact that the GATA–RUNX interaction is conserved between *Drosophila* and mammals. This raises the possibility that a similar functional interaction between GATA and RUNX is important during hematopoietic development in mammals.

Materials and methods

Fly stocks

The *uas-srpC* and *uas-srpNC* transgenic lines were described previously (Waltzer *et al.*, 2002). The plasmacyte-specific driver *pg33-gal4* was

described previously (Bourbon *et al.*, 2002). The *uas-lz*, *lz-gal4*, *srp-gal4* and *srp³* lines were kindly provided by P.Gergen, U.Banerjee, M.Meister and R.Reuter, respectively. Other stocks were provided by the Bloomington *Drosophila* Stock Center. All crosses and embryo collections were carried out at 25°C. Blue balancers or *in situ* hybridization against the transgenes were used to genotype the embryos.

In situ hybridizations and antibody stainings

In situ hybridizations were carried out as previously described (Peyrefitte *et al.*, 2001). RNA probes for *srp*, *crq*, *pxn*, *pro-PO*, *ush*, *gcm* and *lacZ* have been described previously. To generate RNA probes for *doxA3* exon 3 or *lz* cDNA, the corresponding DNA sequences were cloned by PCR in pGemTeasy. The corresponding antisense RNAs were transcribed *in vitro* using T7 or SP6 RNA polymerase.

Double-fluorescent immunostaining and *in situ* hybridization were carried out using fluorescein-UTP labeled *doxA3* antisense probe, mouse anti-fluorescein antibody (1/500) (Roche), goat antimouse antibody conjugated to Alexa Fluor 546 (1/400) (Molecular Probe), rabbit anti- β -gal antibody (1/500) (Cappel Inc. Pharmaceutical) and goat antirabbit antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (1/400) (Molecular Probe).

Pulldown assays

pBS-SrpC, pBS-SrpNC, pGEX2TK-SrpC and pGEX2TK-SrpNC were described previously (Waltzer *et al.*, 2002). These plasmids and pET3c-Lz (Xu *et al.*, 2000) were used as templates to subclone various domains of Srp or Lz into pGEX2TK or into pT7 β link by standard cloning techniques. pGEX2TK-derived expression plasmids were used to produce GST proteins in *Escherichia coli* BL21. pBS or pT7 β link-derived plasmids were used as a template to produce *in vitro* [³⁵S]methionine-labeled proteins using a coupled transcription-translation system (Promega). Interaction assays were performed as described (Waltzer *et al.*, 2002).

Reporter plasmids and mammalian expression vectors

The mouse RUNX1 expression plasmid pCMV-AML1b (McLarren *et al.*, 2000) was provided by S.Stifani. The expression vector for myc-tagged RUNX1 (pCDNA-myc-PEBP2 α B1) (Kim *et al.*, 1999) was provided by Y.Ito. The mouse GATA-1 expression plasmid pCMV-GATA-1 (Newton *et al.*, 2001) was provided by M.Crossley and was used as a template to generate pCDNA3-flag-GATA1 Δ Nter (81–413). Full-length SrpC and SpNC cDNA were subcloned from pBS-SrpC or pBS-SrpNC into the CMV-based expression plasmid pXJ42 to generate pXJ-SrpC and pXJ-SrpNC respectively. pXJ-Ush was described previously (Haenlin *et al.*, 1997). The reporter multimer pGATA-luc contains multimerized GATA binding sites upstream of the β -globin TATA box and the luciferase reporter gene (Newton *et al.*, 2001).

Cells, transfection and reporter assay

COS-7 cells, grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS), were seeded in 12-well culture plates at a density of 0.5×10^4 cells/well and transfected 24 h later using the calcium phosphate method. Fifty nanograms of the β -galactosidase reporter pCMV- β gal was used per transfection as an internal control. Empty pCMV expression vector was added as required to keep the amount of pCMV plasmid constant. pUC plasmid was added as carrier DNA to a total amount of 10 μ g DNA per transfection. Cells were harvested 48 h after transfection, washed in PBS and lysed in reporter lysis buffer (Promega). Luciferase assays were performed using a Lumat LB 9501 luminometer. β -Galactosidase activity was measured with a Galacto-Light Plus kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activities are representative of three independent experiments done in triplicate and have been normalized to β -galactosidase levels.

Immunoprecipitations and immunoblotting

COS-7 cells were plated in 100-mm diameter dishes and transfected using the DEAE/Dextran method. Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice in PBS and lysed for 5 min at 4°C in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.4% NP-40) supplemented with protease inhibitors (Roche). Soluble proteins were collected by centrifugation and diluted (v/v) with dilution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 2.5 mM CaCl₂, 0.4% NP-40) supplemented with DNase. Lysates were incubated for 3 h at 4°C with primary antibody-protein A Sepharose complexes. Immunoprecipitated proteins were washed with lysis buffer/dilution buffer and resolved on SDS-PAGE. Western blotting was performed using standard techniques. Monoclonal anti-Flag (M2) and anti-c-myc antibodies were purchased from Sigma and Roche, respectively.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

We are grateful to J.Smith, P.Blader and B.G.Monster for critically reading the manuscript. We thank B.Augé for expert technical assistance. We also thank U.Banerjee, M.Crossley, P.Gergen, K.Ito, M.Meister, R.Reuter and S.Stifani for plasmids and fly stocks. This work was supported by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). G.F. is supported by a postdoctoral fellowship from the ARC.

References

- Alfonso,T.B. and Jones,B.W. (2002) *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with *glial cells missing* for macrophage development in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **248**, 369–383.
- Bernardoni,R., Vivancos,B. and Giangrande,A. (1997) *glide/gcm* is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev. Biol.*, **191**, 118–130.
- Bourbon,H.M. *et al.* (2002) A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in *Drosophila*. *Mech. Dev.*, **110**, 71–83.
- Elagib,K.E., Racke,F.K., Mogass,M., Khetawat,R., Delehanty,L.L. and Goldfarb,A.N. (2003) RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*, **101**, 4333–4341.
- Evans,C.J. and Banerjee,U. (2003) Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. *Blood Cells Mol. Dis.*, **30**, 223–228.
- Fossett,N., Tevosian,S.G., Gajewski,K., Zhang,Q., Orkin,S.H. and Schulz,R.A. (2001) The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1 and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 7342–7347.
- Franc,N.C., Dimarcq,J.L., Lagueux,M., Hoffmann,J. and Ezekowitz,R.A. (1996) Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, **4**, 431–443.
- Fujiwara,Y., Browne,C.P., Cunniff,K., Goff,S.C. and Orkin,S.H. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 12355–12358.
- Golling,G., Li,L., Pepling,M., Stebbins,M. and Gergen,J.P. (1996) *Drosophila* homologs of the proto-oncogene product PEBP2/CBFB β regulate the DNA-binding properties of Runt. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 932–942.
- Groet,J. *et al.* (2003) Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*, **361**, 1617–1620.
- Haenlin,M., Cubadda,Y., Blondeau,F., Heitzler,P., Lutz,Y., Simpson,P. and Ramain,P. (1997) Transcriptional activity of Pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**, 3096–3108.
- Harigae,H. *et al.* (1998) Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells*, **3**, 39–50.
- Jippo,T., Mizuno,H., Xu,Z., Nomura,S., Yamamoto,M. and Kitamura,Y. (1996) Abundant expression of transcription factor GATA-2 in proliferating but not in differentiated mast cells in tissues of mice: demonstration by *in situ* hybridization. *Blood*, **87**, 993–998.
- Kaminker,J.S., Singh,R., Lebestky,T., Yan,H. and Banerjee,U. (2001) Redundant function of Runt Domain binding partners, Big brother and Brother, during *Drosophila* development. *Development*, **128**, 2639–2648.
- Kim,W.Y., Sieweke,M., Ogawa,E., Wee,H.J., Englmeier,U., Graf,T. and Ito,Y. (1999) Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J.*, **18**, 1609–1620.
- Lebestky,T., Chang,T., Hartenstein,V. and Banerjee,U. (2000) Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science*, **288**, 146–149.
- Lebestky,T., Jung,S.H. and Banerjee,U. (2003) A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev.*, **17**, 348–353.
- McLarren,K.W., Lo,R., Grbavec,D., Thirunavukkarasu,K., Karsenty,G. and Stifani,S. (2000) The mammalian basic helix loop helix protein

- HES-1 binds to and modulates the transactivating function of the runt-related factor Cbfa1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 530–538.
- Michaud, J. *et al.* (2002) *In vitro* analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*, **99**, 1364–1372.
- Nelson, R.E., Fessler, L.I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D.R., Olson, P.F., Parker, C.G. and Fessler, J.H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.*, **13**, 3438–3447.
- Newton, A., Mackay, J. and Crossley, M. (2001) The N-terminal zinc finger of the erythroid transcription factor GATA-1 binds GATC motifs in DNA. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35794–35801.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G. and Downing, J.R. (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, **84**, 321–330.
- Orkin, S.H. and Zon, L.I. (2002) Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat. Immunol.*, **3**, 323–328.
- Persons, D.A., Allay, J.A., Allay, E.R., Ashmun, R.A., Orlic, D., Jane, S.M., Cunningham, J.M. and Nienhuis, A.W. (1999) Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood*, **93**, 488–499.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H. and Costantini, F. (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, **349**, 257–260.
- Peyrefitte, S., Kahn, D. and Haenlin, M. (2001) New members of the *Drosophila* Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix–loop–helix genes. *Mech. Dev.*, **104**, 99–104.
- Querfurth, E., Schuster, M., Kulesa, H., Crispino, J.D., Doderlein, G., Orkin, S.H., Graf, T. and Nerlov, C. (2000) Antagonism between C/EBP β and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.*, **14**, 2515–2525.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M. and Reuter, R. (1996) A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development*, **122**, 4023–4031.
- Rizki, T.M. (1978) The circulatory system and associated tissues. In Wright, T.R.F. (ed.) *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press, New York, pp. 229–335.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M. and Grell, E. (1980) A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, **188**, 91–99.
- Sam, S., Leise, W. and Hoshizaki, D.K. (1996) The *serpent* gene is necessary for progression through the early stages of fat-body development. *Mech. Dev.*, **60**, 197–205.
- Song, W.J. *et al.* (1999) Haploinsufficiency of *CBFA2* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat. Genet.*, **23**, 166–175.
- Speck, N.A. and Gilliland, D.G. (2002) Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 502–513.
- Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A. and Hartenstein, V. (1994) Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development*, **120**, 1829–1837.
- Tsai, F.Y. and Orkin, S.H. (1997) Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, **89**, 3636–3643.
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. and Orkin, S.H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**, 109–119.
- Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B. and Orkin, S.H. (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.*, **12**, 1176–1188.
- Vyas, P., Ault, K., Jackson, C.W., Orkin, S.H. and Shivdasani, R.A. (1999) Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*, **93**, 2867–2875.
- Waltzer, L., Bataillé, L., Peyrefitte, S. and Haenlin, M. (2002) Two isoforms of *Serpent* containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *EMBO J.*, **21**, 5477–5486.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H. and Speck, N.A. (1996) Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 3444–3449.
- Wang, X., Crispino, J.D., Letting, D.L., Nakazawa, M., Poncz, M. and Blobel, G.A. (2002) Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J.*, **21**, 5225–5234.
- Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M. and Crispino, J.D. (2002) Acquired mutations in *GATA1* in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat. Genet.*, **32**, 148–152.
- Xu, C., Kauffmann, R.C., Zhang, J., Kladny, S. and Carthew, R.W. (2000) Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye. *Cell*, **103**, 87–97.
- Yamaguchi, Y., Nishio, H., Kishi, K., Ackerman, S.J. and Suda, T. (1999) C/EBP β and GATA-1 synergistically regulate activity of the eosinophil granule major basic protein promoter: implication for C/EBP β activity in eosinophil gene expression. *Blood*, **94**, 1429–1439.

Received September 1, 2003; revised October 6, 2003;
accepted October 22, 2003

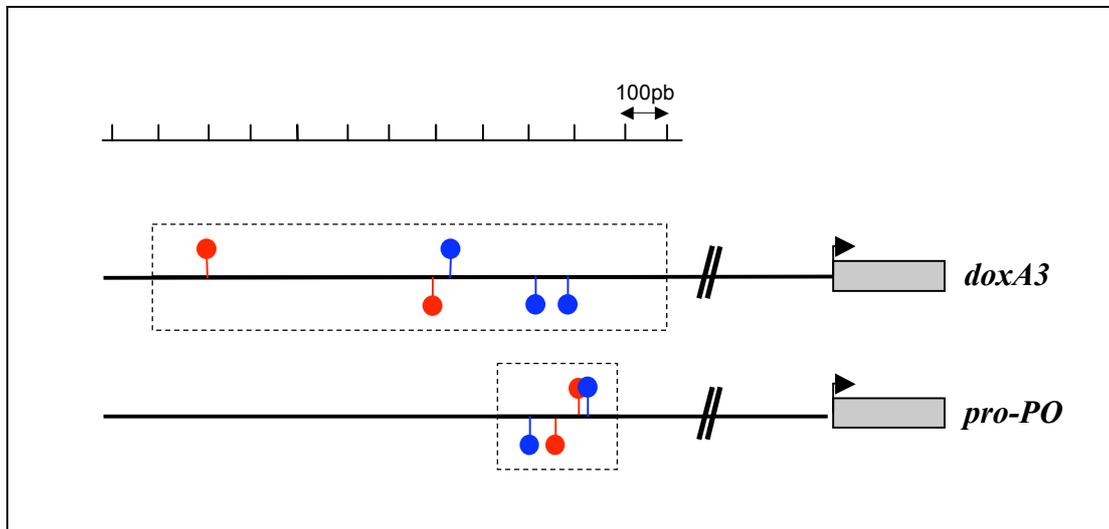


Figure 21 : Les promoteurs de *doxA3* et *pro-PO* contiennent plusieurs sites GATA et RUNX. Cartographie réalisée avec Mat Inspector // www.genomatix.de. Les points bleus représentent les sites GATA, les points rouges représentent les sites RUNX. En encadré, les séquences enhancer suffisantes pour reproduire l'expression des gènes endogènes *in vivo* (Géraldine FERJOUX, communication personnelle).

D. Discussion

1. Régulation de l'expression des gènes cibles par le complexe Srp/Lz

Nous avons montré que Srp et Lz coopèrent *in vivo* pour induire spécifiquement les marqueurs de différenciation des cellules à cristaux (*doxA3*, *pro-PO*). À l'inverse, nos résultats montrent que Lz n'influence pas l'expression des gènes répresseurs de ce lignage (*ush*, *gcm*). Ceci suggère que la coopération transcriptionnelle entre Srp et Lz est restreinte aux gènes exprimés dans les cellules à cristaux. Comme précédemment, l'une des questions qui se pose est de savoir comment se fait la reconnaissance des gènes cibles spécifiques du complexe Srp/Lz. Lz est un facteur de transcription de type RUNX, qui reconnaît les séquences consensus de type TGYGGTY (séquence Runx). Cette donnée permet de poser l'hypothèse que les cibles du complexe Srp/Lz possèdent dans leur promoteur à la fois une séquence de fixation de type GATA et une séquence de type Runx. Cette signature pourrait être directement responsable de la reconnaissance des gènes cibles du complexe GATA/RUNX. Les séquences promotrices de *doxA3* et de *pro-PO* contiennent effectivement des sites de fixations aux facteurs Srp et Lz alors que les promoteurs de *ush* et *gcm* ne contiennent que des sites GATA (Figure 21), ce qui soutient cette hypothèse. Cependant, les expériences que nous avons réalisées en culture cellulaire montrent que le complexe Srp/Runx1 induit de manière synergique l'expression d'un gène rapporteur sous contrôle d'un multimère GATA, c'est à dire en absence de sites de fixation au facteur RUNX. L'analyse des promoteurs des gènes cibles *doxA3* et *pro-PO* devrait permettre de déterminer s'il existe une signature spécifique du complexe Srp/Lz ou si la présence de l'un des deux sites de fixation GATA ou Runx est suffisante pour recruter le complexe.

2. Régulation de la différenciation des cellules à cristaux

Cette étude a permis de mettre en évidence *in vivo* que Srp (SrpC ou SrpNC) et Lz coopèrent pour induire la différenciation des cellules à cristaux. Précédemment, j'ai présenté des données qui montrent que la formation du complexe SrpNC/Ush est impliqué dans la répression de la formation de ce lignage. Nous avons montré, par des tests d'activité en culture cellulaire, que la présence du corépresseur Ush réprime spécifiquement la

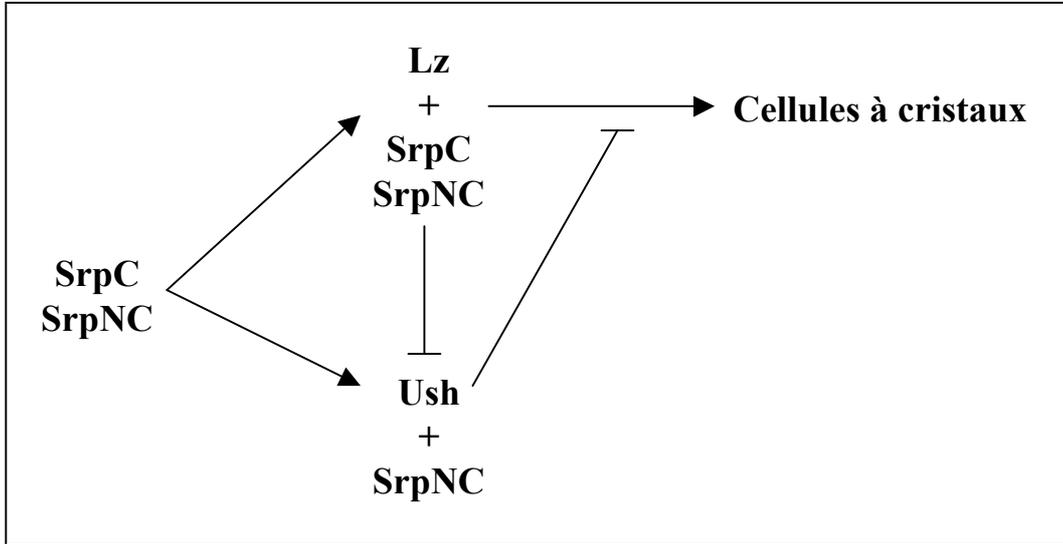


Figure 22 : Régulation de la différenciation des cellules à cristaux.

transactivation d'un gène rapporteur par SrpNC/Runx1 mais pas par SrpC/Runx1. Ces données suggèrent que Ush rentre en compétition avec Lz pour former un complexe avec SrpNC.

De manière intéressante, Fossett et al. ont montré *in vivo* qu'en plus de l'effet synergique entre Srp et Lz sur la différenciation des cellules à cristaux, la coexpression de l'isoforme SrpNC et de Lz réprime l'expression de *ush* (Fossett et al., 2003). Ces données sont en contradiction avec nos résultats puisque nous montrons que la surexpression de Lz ne perturbe pas l'induction ectopique de *ush* induite par SrpC ou SrpNC. Cependant une hypothèse peut être proposée pour expliquer cette différence : les constructions UAS utilisées dans ces deux travaux sont différentes. Il est donc envisageable que le niveau d'expression des transgènes ne soit pas équivalent. Ceci pourrait avoir une importance cruciale étant donné que dans ce système, la formation des complexes semble dépendre de l'équilibre relatif entre les différents protagonistes. On peut donc envisager que la surexpression massive de SrpNC dans notre expérience induise l'expression de *ush* de manière drastique et masque la répression de *ush* par SrpNC/Lz. Ces données contradictoires soulèvent un problème majeur lié aux expériences de surexpression *in vivo* chez la Drosophile : les surexpressions par le système UAS/Gal4 ne permettent pas de maîtriser les niveaux d'expression des protéines, ce qui peut être problématique lorsqu'on s'adresse à un système où la stœchiométrie des différents facteurs est importante. Les résultats de Fossett et al. suggèrent aussi que le complexe SrpNC/Lz peut avoir une activité répressive. Ceci soulève de nouvelles questions : (1) Quel est le mécanisme qui régule l'activité répressive *versus* activité activatrice du complexe Srp/Lz ? (2) Existe-t-il une « signature » au niveau des promoteurs des gènes cibles qui permet le recrutement spécifique d'un complexe Srp/Lz activateur ou Srp/Lz répresseur. L'analyse et la comparaison des promoteurs de *doxA3*, de *pro-PO* et de *ush* pourraient permettre de répondre à ces questions.

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un réseau d'interactions qui contrôle la différenciation des cellules à cristaux (Figure 22). Dans un premier temps, Srp est requis pour permettre l'expression de *lz* et de *ush*. Puis, Srp et Lz interagissent pour induire l'engagement des précurseurs Lz⁺ vers une voie de différenciation en inhibant le répresseur Ush, alors que la formation d'un complexe SrpNC/Ush inhibe la différenciation des cellules à cristaux. Srp joue donc un rôle central dans la différenciation de ce lignage en fonctionnant soit comme activateur en association avec Lz soit en tant que répresseur en association avec Ush.

3. Interaction entre Lz et des cofacteurs

Les facteurs de transcription de type RUNX sont connus pour former des complexes avec des co-régulateurs de la transcription (pour revue (Canon and Banerjee, 2000)). Notamment, chez les vertébrés, Runx1 forme des complexes hétérodimériques avec CBF β via son domaine de liaison à l'ADN. Les protéines de type CBF β ne lient pas directement l'ADN mais augmentent l'affinité de liaison à l'ADN des RUNX. Chez la Drosophile, il existe deux membres de la famille CBF β : Brother (Bro) et Big brother (Bgb). De plus, le domaine de liaison à l'ADN des facteurs RUNX est très conservé, ce qui suggère l'existence d'une interaction entre Lz et Bro/Bgd chez la Drosophile. Ces facteurs sont exprimés de manière ubiquitaire au stade embryonnaire, mais leur rôle éventuel lors de l'hématopoïèse embryonnaire reste à établir. De plus, Lz contient un domaine VWRPY en C-terminal très conservé dans la famille RUNX. Ce domaine permet de recruter le corépresseur Groucho (Gro). Gro est incapable de se lier à l'ADN mais fonctionne comme corépresseur des facteurs de transcription.

De plus, Canon et al. (Canon and Banerjee, 2003) ont mis en évidence l'existence d'une signature responsable de la régulation de l'activité transcriptionnelle de Lz dans l'œil. En effet, dans le disque œil-antenne, *lz* régule différenciellement l'expression de deux gènes : Lz réprime l'expression de *deadpan* (*dpn*) et induit l'expression de *D-pax2*. Dans le promoteur de *dpn*, chaque site de liaison à Lz est suivi par une séquence riche en AT. Au contraire, dans le promoteur de *D-pax2*, on ne retrouve pas de telles séquences. Canon et al. ont montré que la protéine à homéodomaine Cut lie les séquences riches en AT et est requise pour la répression de *dpn* par Lz en stabilisant le complexe répresseur Lz/Gro. Cette étude met en évidence, d'une part la formation d'un complexe répressif entre Lz, la protéine à homéodomaine Cut et le corépresseur Gro et, d'autre part l'existence d'une signature au niveau des séquences régulatrices des gènes cibles qui permet une spécificité de reconnaissance par le complexe Lz/Cut. Ainsi, Cut permet de stabiliser le complexe Lz/Gro et transforme le facteur activateur RUNX en facteur répresseur.

Ainsi, Lz est donc capable, d'une part, d'induire les gènes cibles des cellules à cristaux par formation d'un complexe avec Srp et d'autre part, de réprimer l'expression de certains gènes cibles par formation d'un complexe répresseur Lz/Cut/Gro comme le montrent les travaux de Canon et al.. Ces données illustrent la capacité de Lz à interagir avec un certain nombre de cofacteurs capables de moduler son activité transcriptionnelle.

III. Conclusion et perspectives

A. Rôles de Srp au cours de l'hématopoïèse embryonnaire

Chez les vertébrés, plusieurs facteurs GATA interviennent à différentes étapes de l'hématopoïèse. Ainsi, GATA-2 contrôle l'étape précoce de survie et de prolifération des cellules souches hématopoïétiques, alors que GATA-1 et GATA-3 interviennent respectivement lors des phases de différenciation de la lignée érythropoïétique et lymphoïde (Orkin et al., 1998). Les facteurs GATA sont donc impliqués dans les étapes de spécification et de différenciation des lignages sanguins. Chez la Drosophile, seul le facteur GATA Srp intervient au cours de ce processus. *srp* est exprimé précocement, à partir du stade 5 puis son expression est maintenue lors de la différenciation des deux lignages sanguins embryonnaires. Par comparaison avec les rôles des facteurs vertébrés GATA, deux questions se posent alors :

- Est-ce que Srp intervient à différentes étapes de l'hématopoïèse?
- Est-ce que l'activité de ce facteur est modulée par des partenaires au cours de ce processus ?

Initialement, la seule fonction de *srp* décrite dans la littérature portait sur le rôle essentiel de ce facteur dans la spécification et la maintenance des prohématocytes (Rehorn et al., 1996). Nos résultats montrent que Srp intervient aussi plus tardivement lors de la différenciation des deux lignages plasmacytes et cellules à cristaux. D'une part, nous avons montré que Srp, en association avec Ush, contrôle l'expression de *crq*, marqueur de différenciation des plasmacytes, d'autre part, nous avons mis en évidence que Srp induit la différenciation des cellules à cristaux en formant un complexe avec Lz.

Les résultats présentés ici illustrent comment l'unique facteur GATA Srp est réutilisé aux différentes étapes de l'hématopoïèse et comment son activité est modulée par le recrutement de différents cofacteurs. Ceci correspond à la démonstration *in vivo* de la dynamique d'interaction entre les facteurs de transcription et de l'influence de ces interactions sur la sélection des lignages, plasmacytes *versus* cellules à cristaux.

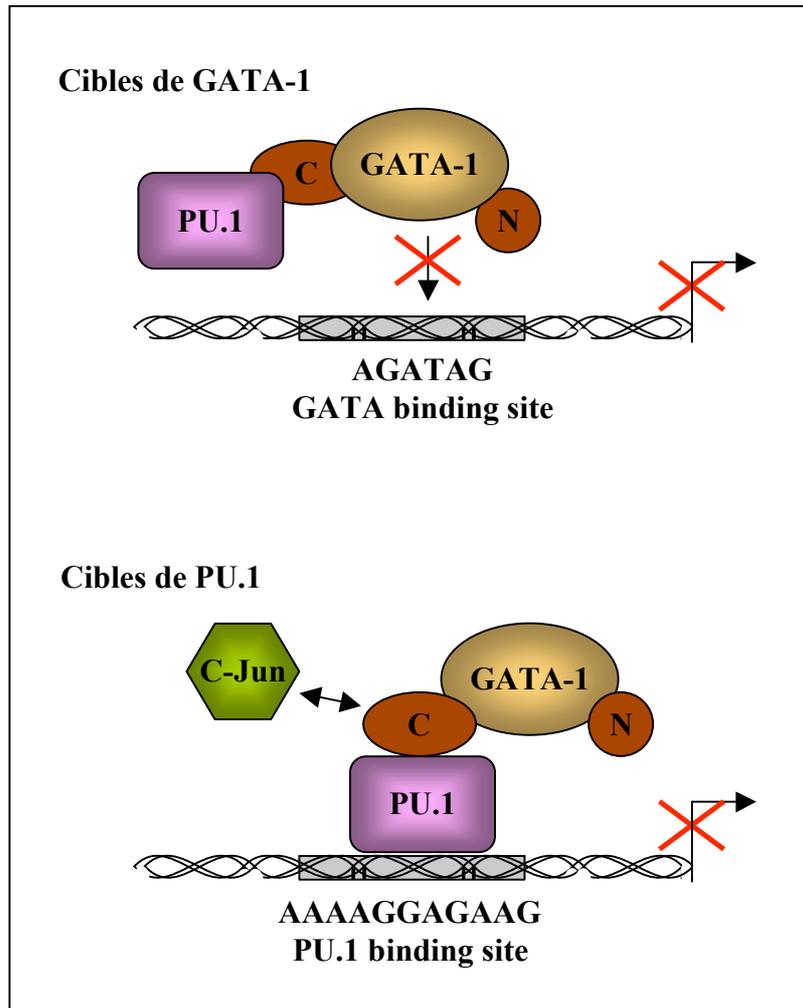


Figure 23 : Régulation de l'activité de GATA-1 par le facteur Ets PU.1.

B. Modulation de l'activité des facteurs GATA par formation de complexes

Chez les vertébrés, le facteur GATA-1 qui est le membre fondateur de la famille GATA a été particulièrement étudié. De nombreuses études ont mis en évidence que GATA-1 interagit avec un grand nombre de cofacteurs, dont FOG, Lmo2 (LIM-only protein 2), EKLF (erythroid kruppel-like factor) et Pu.1 (pour revue (Morceau et al., 2004)). En se basant sur les données établies chez les vertébrés, je discuterais ici de la modulation éventuelle de l'activité de Srp par d'autres cofacteurs.

1. Interactions entre facteurs GATA et Ets

Chez les vertébrés, PU.1 est un facteur de transcription de la famille Ets spécifique de l'hématopoïèse. PU.1 est requis pour le développement des lignages lymphoïdes et myéloïdes. D'autre part, il a été montré que PU.1 inhibe la différenciation des érythrocytes en réprimant l'activation transcriptionnelle de GATA-1. L'interaction directe de PU.1 avec le domaine de liaison à l'ADN de GATA-1 est nécessaire pour bloquer la différenciation érythroïde. Récemment, il a été montré que PU.1 coopère avec le corépresseur pBR pour inhiber GATA-1 et bloquer la différenciation érythroïde (Rekhtman et al., 2003). De plus, il est proposé que le complexe GATA-1/PU.1 inhibe l'activation par GATA-1 sur les gènes cibles de GATA-1 et à l'inverse, GATA-1 est capable d'inhiber la fonction de PU.1 en rentrant en compétition avec c-Jun qui est le coactivateur de PU.1. (Figure 23). Ces données mettent en évidence l'existence d'une régulation de l'activité des facteurs GATA par les facteurs Ets.

Chez la Drosophile, le facteur Pointed (Pnt) correspond à un facteur de type Ets. De manière intéressante, il a été montré que Pnt, comme le facteur GATA Pnr, est impliqué dans la formation précoce des cellules cardiaques et péricardiaques (Alvarez et al., 2003). En effet, *pnt* a été isolé lors d'un crible génétique visant à identifier des gènes impliqués dans la formation du cœur. Dans ce système, des tests génétiques ont mis en évidence que *pnr* induit l'expression de *pnt*. Cependant, la régulation de l'activité du facteur GATA Pnr par le facteur Ets Pnt n'a pas été analysée. D'autre part, une étude récente suggère que chez la Drosophile, lors du développement de l'œil, Pointed régule l'activité de Lz (Jackson Behan et al., 2005).

Les auteurs ont montré que, par épissage alternatif, plusieurs transcrits de *lz* sont générés ce qui permet la production d'un facteur Lz possédant ou non le domaine d'interaction avec Pnt. Chez les vertébrés, il a été montré que l'interaction entre le facteur Runx1 et Ets-1 favorise la liaison à l'ADN de Runx1 et augmente l'activité transcriptionnelle de ce facteur. L'ensemble de ces données suggère que les facteurs Ets ont un rôle essentiel dans la modulation de l'activité des facteurs de transcription de type GATA et RUNX, aussi bien chez les vertébrés que chez la Drosophile.

De plus, une étude préliminaire suggère que le facteur Ets, Pointed pourrait être impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse. En effet, lors d'un crible génétique, il a été montré que la surexpression de Pnt dans les hémocytes larvaires induit une surprolifération des hémocytes et la formation de tumeurs mélaniques (Zettervall et al., 2004). Ceci suggère un rôle de *pnt* dans la régulation de la formation des lignages sanguins. Cependant, le rôle éventuel de ce facteur Ets dans la régulation de l'hématopoïèse embryonnaire reste à établir. D'autre part, dans le génome de la Drosophile, six gènes codant pour des facteurs de type Ets ont été prédits, dont *pnt*, mais il n'y a aucune donnée sur la fonction des autres facteurs Ets.

2. Interactions entre facteurs GATA, bHLH et LIM

En 1997, Wadman et al. ont montré que GATA-1 faisait partie d'un complexe multiprotéique potentiellement impliqué dans la différenciation érythrocytaire. Ainsi, les auteurs ont mis en évidence que GATA-1 interagit avec le facteur à domaine LIM, Lmo2 (LIM only protein 2). Les facteurs LIM sont surtout connus pour leur capacité à lier les facteurs GATA et bHLH. La formation de l'hétérodimère GATA-1/Lmo2 sert ainsi de plateforme nécessaire pour le recrutement des autres composants du complexe : la protéine Lbd1 (LIM-domain-binding factor 1) et les bHLH SCL/TAL1 (Stem Cell Leukemia/ T-Cell Acute Leukemia) et E2A. Ainsi, Lmo2 agit dans les cellules érythroïdes en assurant, en association avec la protéine Lbd1, un pontage entre l'hétérodimère bHLH SCL/E2A d'une part et la protéine GATA-1 d'autre part. De plus, les auteurs montrent que cet hétérodimère reconnaît des séquences enhancer comportant à la fois une E-Box (site de fixation des facteurs bHLH) et un site GATA séparés de 9 nucléotides (Wadman et al., 1997). La mise en évidence d'un tel complexe protéique illustre la complexité des interactions entre GATA-1 et ses cofacteurs.

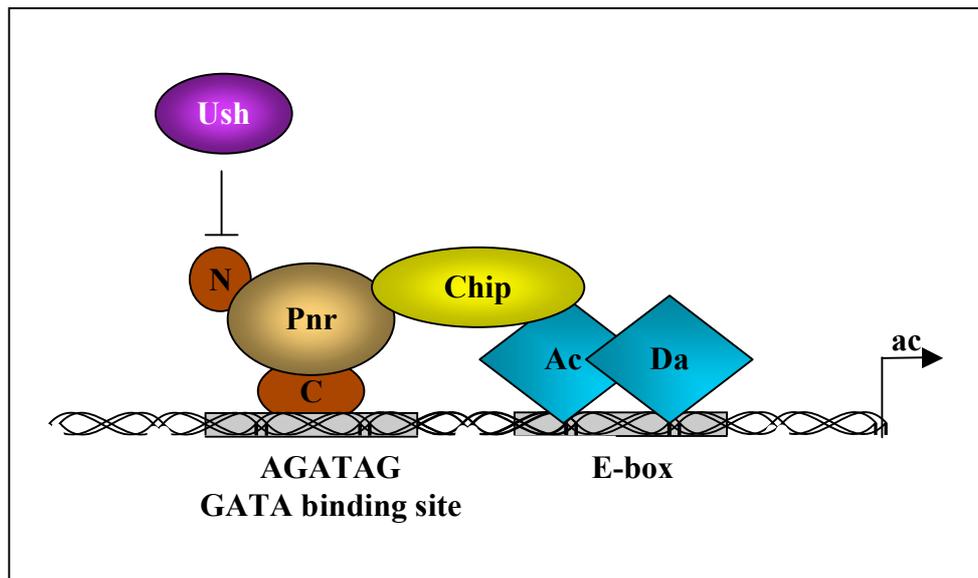


Figure 24 : Régulation de l'activité de Pnr par les facteurs Chip et Ac/Da.

Chez la *Drosophile*, un complexe similaire au complexe décrit par Wadman et al. participe à la formation des soies sensorielles thoraciques (Ramain et al., 2000). Ces structures adultes sont issues d'un précurseur SOP (Sensory Organ Precursor) qui est spécifié au cours du troisième stade larvaire et du stade pupa. Le précurseur SOP est issu d'un cluster proneural caractérisé par l'expression des gènes bHLH *achaete* (*ac*) et *scute* (*sc*). Le facteur GATA, Pnr est un activateur direct de *ac/sc*. Il a été montré dans ce contexte que l'un des cofacteur de Pnr (outre Ush) est Chip. Chip correspond à l'unique membre de la famille des LIM-domain-binding factor (Lbd) chez la *Drosophile*. Les phénotypes pertes de fonction de *pnr* et *chip* sont similaires et correspondent à la diminution de l'expression des bHLH *ac-sc* ce qui induit la perte des soies sensorielles situées en position dorso-centrale. Au plan moléculaire, Ramain et al. ont montré que Chip dimérise avec Pnr *via* le domaine C-terminal du facteur GATA, et avec l'hétérodimère bHLH Ac:Sc/Da par son domaine C-terminal LID (Figure 24). De plus, les auteurs ont montré que ce complexe est capable d'induire une activation synergique d'un gène rapporteur contenant des sites de fixations E-box et GATA en culture cellulaire et *in vivo*. D'autre part, Pnr interagit aussi avec la protéine à domaine LIM, dLMO2. dLMO2 pourrait donc participer à la formation de ce complexe multiprotéique. Ces données suggèrent que dans ce système, l'activation des gènes proneuraux requiert la formation d'un complexe Pnr/Chip/Ac:Sc/Da où Chip agit comme un pont entre Pnr et l'hétérodimère Ac:Sc/Da (Ramain et al., 2000).

La conservation des mécanismes de régulation de l'activité des facteurs GATA, entre la *Drosophile* et les vertébrés, indique qu'au cours de l'hématopoïèse chez la *Drosophile*, il est envisageable qu'un tel complexe multiprotéique intervienne dans la modulation de l'activité du facteur GATA Srp. Cependant, à ce jour, très peu de données existent sur la fonction des facteurs bHLH au cours de l'hématopoïèse embryonnaire ou larvaire chez la *Drosophile*.

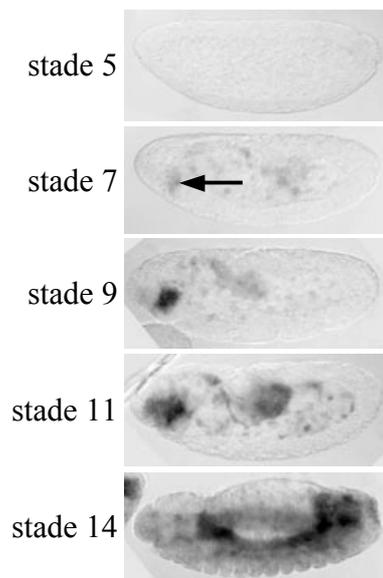


Figure 25 : Patron d'expression de *CG17100* au cours de l'embryogenèse. Hybridation *in situ* contre *CG17100*. L'expression de *CG17100* est détectée au niveau du territoire hématopoïétique à partir du stade 7 (flèche). Noter que *CG17100* est aussi exprimé dans d'autres territoires, notamment l'endoderme.

3. Fonction des bHLH au cours de l'hématopoïèse chez la Drosophile

Chez les mammifères, le gène SCL/Tal1 qui code pour un facteur de transcription à domaine bHLH, est nécessaire à la formation de l'ensemble des lignages sanguins primitifs et définitifs (Shivdasani et al., 1995). SCL/Tal1 jouerait un rôle majeur dans l'étape initiale de spécification des précurseurs mésodermiques vers le destin cellule souche hématopoïétique. La fonction de ce gène au cours de l'hématopoïèse a été particulièrement bien étudiée chez les vertébrés. Au contraire, chez la Drosophile, très peu de données indiquent que les facteurs de transcription à domaine bHLH pourraient être impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse.

Récemment, Han et al. ont mis en évidence pour la première fois l'expression d'un bHLH, Hand, au cours de l'hématopoïèse larvaire (Han and Olson, 2005). *hand* (*CG18144*) est exprimé à partir du stade 11 de l'embryogenèse dans tout le mésoderme cardiogénique, puis son expression est détectée dans les cardioblastes, les cellules péricardiaques et les précurseurs de la glande lymphatique. De plus, son expression dans la glande est induite par Srp. Cependant la fonction de ce gène lors de l'hématopoïèse larvaire et notamment lors de la spécification des précurseurs de la glande lymphatique reste inconnue.

Au stade embryonnaire, nous avons identifié au laboratoire un gène, *CG17100*, qui code pour un facteur bHLH exprimé au niveau du territoire hématopoïétique (Peyrefitte et al., 2001). *CG17100* est exprimé à partir du stade 7 au niveau du territoire de formation des prohémostocytes (Figure 25) et son expression colocalise avec celle *gcm*, précocement et lors de l'invagination des hémocytes (Sandrine PEYREFITTE, communication personnelle). Ceci suggère que l'expression de *CG17100* est restreinte à la population de plasmocytes. Des tests d'épistasie ont montré que l'expression de *CG17100* est contrôlée par *srp*. Nous avons analysé la fonction de *CG17100* au cours de l'hématopoïèse embryonnaire par une approche génétique classique en perte et gain de fonction de ce gène. Pour cela, j'ai dans un premier temps entrepris de générer un mutant perte de fonction de *CG17100*. Dans les différents contextes mutants perte ou gain de fonction, nous avons analysé les phénotypes associés aux plasmocytes et aux cellules à cristaux. Cependant, l'analyse des phénotypes dans ces différents contextes mutants pour *CG17100* ne m'a pas permis de mettre en évidence de défaut dans la formation des hémocytes lors de l'hématopoïèse embryonnaire. Au stade larvaire, nous n'avons analysé ni l'expression ni la fonction de ce gène au cours de la seconde vague d'hématopoïèse.

De nombreux mécanismes de spécification et de différenciation des cellules sanguines sont conservés entre la *Drosophile* et les vertébrés. Il est donc envisageable qu'un facteur bHLH, qu'il reste à identifier, participe au contrôle de l'hématopoïèse chez la *Drosophile* au stade embryonnaire et/ou larvaire.

CHAPITRE II :

Etude du processus de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires

I. Introduction

A. Serpent et l'établissement des lignages

Les études précédentes ont permis de mettre en évidence le rôle de *srp* à différentes étapes de l'hématopoïèse et permettent d'expliquer au moins partiellement la régulation des étapes de différenciation des cellules à cristaux et des plasmacytes. Cependant, la mise en évidence de la modulation de l'activité de *srp* au cours de ce processus n'explique pas comment est régulé l'engagement des prohématocytes vers une voie de différenciation spécifique. En effet, au stade blastoderme (stade 5), l'expression de *srp* va spécifier la formation de tous les précurseurs hématopoïétiques (Rehorn et al., 1996). Puis, à partir de cette population, les deux lignages hématopoïétiques vont émerger (Lebestky et al., 2000). Comment passe-t-on d'une population de prohématocytes *Srp*⁺ qui semble homogène, à des cellules engagées dans un destin de différenciation spécifique ? Il semble, d'après les données de la littérature, que les facteurs *Gcm/Gcm2* et *Lz* soient respectivement impliqués dans la spécification d'un destin plasmacytes ou cellules à cristaux.

B. *Gcm* et *Lz*, les facteurs dits « lignage spécifiques »

Des travaux ont mis en évidence que *Gcm* et *Gcm2* participent à la formation et à la différenciation des plasmacytes (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997), alors que *lz* est nécessaire pour induire la formation des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000). Il a été montré que la perte de fonction de *gcm* ou de *gcm* et *gcm2* ne modifie pas le nombre de cellules qui expriment *lz* (Alfonso and Jones, 2002; Lebestky et al., 2000), et réciproquement,

la perte de fonction de *lz* n'affecte pas la formation des plasmatoctes (Lebestky et al., 2000). Ces données suggèrent donc que *Gcm* (*Gcm* et *Gcm2*) et *Lz* sont respectivement spécifiques des plasmatoctes et des cellules à cristaux et Lebestky et al. ont proposé que *gcm* et *lz* s'expriment de façon mutuellement exclusives (Lebestky et al., 2000). L'expression forcée de *Gcm* dans les précurseurs *Lz*⁺ (*lz-gal4 ; uas-gcm*) réprime leur différenciation en cellules à cristaux et induit leur différenciation en plasmatoctes. Ces cellules acquièrent en effet une morphologie de type plasmatoctes et expriment des marqueurs de différenciation spécifiques de ce lignage (Lebestky et al., 2000). A l'inverse, nous avons montré que la surexpression de *Lz* dans les précurseurs des plasmatoctes induit l'expression des marqueurs de différenciation spécifiques des cellules à cristaux mais sans réprimer leur différenciation en plasmatoctes. Ces cellules gardent en effet une morphologie caractéristique des plasmatoctes, mais expriment en plus des marqueurs de différenciation spécifiques des cellules à cristaux (Waltzer et al., 2003). Ces données montrent donc que *Gcm* est suffisant pour diriger les hémocytes vers un destin plasmatoctes et pour réprimer leur différenciation en cellules à cristaux, et qu'à l'inverse, *Lz* est capable d'induire la formation des cellules à cristaux, mais ne réprime pas la formation des plasmatoctes. Les relations entre ces deux facteurs « lignages spécifiques » ne sont donc pas équivalentes.

Une autre donnée surprenante vient de la dynamique d'expression de ces facteurs « lignages spécifiques ». En effet, l'expression de *gcm1* et de *gcm2* débute au stade 5, dès l'apparition des prohémocytes (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997). Au contraire, *lz* commence à être exprimé beaucoup plus tardivement, au stade 10 soit environ 2h 20 plus tard (Lebestky et al., 2000). Ces données suggèrent soit que la spécification des cellules à cristaux est plus tardive que celle des plasmatoctes, soit qu'il existe un intermédiaire entre la spécification des cellules à cristaux et l'expression de *lz*. Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait que *Lz* se comporte plus comme un facteur de différenciation que comme un facteur de ségrégation puisqu'il est suffisant pour induire le programme de différenciation des cellules à cristaux mais incapable de réprimer le destin plasmatoctes (Waltzer et al., 2003). Il est proposé que les hémocytes qui expriment *gcm* se différencient en plasmatoctes alors que les cellules qui expriment *lz* se différencient en cellules à cristaux, ces deux facteurs étant strictement exclusifs. Cependant, la différence de cinétique d'expression entre ces facteurs soulève la question de la dynamique d'apparition des deux populations plasmatoctes et cellules à cristaux.

En fait, l'ensemble des données de la littérature donne un tableau assez confus des mécanismes de ségrégation des deux populations. Et de nombreuses questions sont posées:

- À quel moment les deux populations ségrègent-elles ?
- Est-ce que les plasmacytes et les cellules à cristaux émergent du même pool de prohéocytes ?
- Quelles sont les relations entre *gcm* et *lz* au cours de ce choix de lignage ?

Afin d'apporter une réponse à ces différentes questions, nous avons donc entrepris de caractériser l'étape précoce de ségrégation des deux populations de cellules hématopoïétiques embryonnaires. Dans cette étude, j'ai mené dans un premier temps une analyse descriptive de l'étape de ségrégation en m'attachant à l'expression précoce des marqueurs de lignages. Dans un second temps, nous avons réalisé une analyse génétique des relations entre *gcm* et *lz*.

II. Résultats : résumé

Nous avons analysé le processus de ségrégation qui mène à la formation de ces deux populations et la relation entre *Lz* et *Gcm/Gcm2* au cours de cette étape précoce de l'hématopoïèse.

- (1) L'analyse descriptive de la ségrégation nous a permis de mettre en évidence que cette étape correspond à un processus très dynamique qui prend place dans une fenêtre de temps d'environ 20 minutes après l'apparition des prohéocytes. Nous avons montré que, de manière surprenante, *gcm* est exprimé dans l'ensemble des prohéocytes au stade blastoderme. Puis, très rapidement, au stade 6, l'expression de *gcm* est réprimée de manière localisée, uniquement dans la première rangée antérieure de prohéocytes. Ces prohéocytes qui arrêtent d'exprimer *gcm* initient alors très rapidement l'expression de *lz* (stade 7) ce qui définit la population de progéniteurs *Lz*⁺. Le devenir de ces progéniteurs *Lz*⁺ est double : la majorité de ces progéniteurs va se différencier en cellules à cristaux, mais on observe que 40% d'entre eux vont se différencier en plasmacytes.
- (2) Nous avons montré que *Gcm* et *Gcm2* interviennent dans la régulation du nombre de cellules à cristaux formées en réprimant l'induction et la maintenance de *Lz*. En effet, l'analyse fonctionnelle de *Lz* et *Gcm/Gcm2* au cours de cette étape de ségrégation nous a permis de mettre en évidence une régulation originale en deux étapes. Dans un

premier temps, Gcm/Gcm2 régulent le nombre de progéniteurs Lz⁺ formés en limitant l'induction précoce de *lz*. Néanmoins, même en absence de *gcm/gcm2*, l'induction de *lz* reste restreinte à une sous-population de prohémyocytes. Cette dernière donnée met en évidence l'existence d'une subdivision précoce du territoire hématopoïétique. Dans un second temps, Gcm/Gcm2 régule la différenciation des progéniteurs Lz⁺ en cellules à cristaux ou en plasmacytes. En effet nous avons montré que Gcm réprime la maintenance de *lz*, qui est elle-même dépendante d'une boucle d'autorégulation. Ces résultats suggèrent que la différenciation des progéniteurs Lz⁺ dépend du niveau relatif de Lz et Gcm/Gcm2.

- (3) Enfin nous avons montré que les prohémyocytes Srp⁺ sont des précurseurs bipotents, capables de générer uniquement des plasmacytes ou uniquement des cellules à cristaux. En effet, en absence de *gcm/gcm2*, les prohémyocytes se différencient exclusivement en cellules à cristaux lorsqu'on induit *lz* de manière précoce dans toute la population Srp⁺.

III. Résultats : publication

Resolving embryonic blood cell fate choice in Drosophila : interplay of GCM and RUNX factors.

Laetitia BATAILLÉ, Benoit AUGÉ, Géraldine FERJOUX, Marc HAENLIN and Lucas WALTZER

Development (2005) 132(20):4635-44.

Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors

Laetitia Bataillé, Benoit Augé, Géraldine Ferjoux, Marc Haenlin* and Lucas Waltzer

Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR 5547, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

*Author for correspondence (e-mail: haenlin@cict.fr)

Accepted 9 August 2005

Development 132, 4635-4644
Published by The Company of Biologists 2005
doi:10.1242/dev.02034

Summary

The differentiation of *Drosophila* embryonic blood cell progenitors (prohemocytes) into plasmatocytes or crystal cells is controlled by lineage-specific transcription factors. The related proteins Glial cells missing (GCM) and GCM2 control plasmatocyte development, whereas the RUNX factor Lozenge (LZ) is required for crystal cell differentiation. We have investigated the segregation process that leads to the formation of these two cell types, and the interplay between LZ and GCM/GCM2. We show that, surprisingly, *gcm* is initially expressed in all prohemocytes but is rapidly downregulated in the anterior-most row of prohemocytes, which then initiates *lz* expression. However, the *lz*+ progenitors constitute a mixed-lineage population whose fate depends on the

relative levels of LZ and GCM/GCM2. Notably, we demonstrate that GCM/GCM2 play a key role in controlling the size of the crystal cell population by inhibiting *lz* activation and maintenance. Furthermore, we show that prohemocytes are bipotent progenitors, and that downregulation of *gcm/gcm2* is required for *lz*-induced crystal cell formation. These results provide new insight into the mechanisms controlling *Drosophila* hematopoiesis and establish the basis for an original model for the resolution of the choice of blood cell fate.

Key words: RUNX, GCM, Hematopoiesis, Cell fate choice, *Drosophila*

Introduction

Understanding how cell lineages are established remains a central task in developmental biology and particularly in the field of hematopoiesis. Strikingly, it has become clear over the past few years that several aspects of hematopoiesis have been conserved between *Drosophila* and man (Evans et al., 2003). Thus, *Drosophila* may provide a valuable model system with which to gain insight into the mechanisms of blood cell lineage segregation in vivo. As in vertebrates, hematopoiesis in the fruit fly occurs in two waves: blood cell progenitors arise from the head mesoderm in the early embryo and from a specialised organ, the lymph gland, in the larva (Holz et al., 2003). These progenitors (prohemocytes) give rise to three terminally differentiated cell types (collectively called hemocytes), related to the vertebrate myeloid lineages: plasmatocytes, crystal cells and lamellocytes (Meister, 2004). Approximately 95% of hemocytes are plasmatocytes, which function as macrophages, engulfing apoptotic cells and small pathogens such as bacteria (Sears et al., 2003; Tepass et al., 1994). Crystal cells constitute a smaller population of blood cells (about 5%) that participate in melanisation, an insect-specific process involved in wound healing and the encapsulation of foreign invaders (Rizki et al., 1980). Finally, the lamellocytes encapsulate foreign bodies too large to be engulfed by macrophages (Crozatier et al., 2004). They are only generated during larval hematopoiesis, under specific conditions such as parasitisation of the larvae by wasp eggs.

Despite the evolutionary distance between *Drosophila* and

vertebrates, many of the molecular pathways governing hematopoiesis have been conserved (Evans et al., 2003). In particular, transcription factors of the GATA, FOG and RUNX families, which regulate several steps of hematopoiesis in vertebrates, also control *Drosophila* hematopoiesis (Fossett et al., 2001; Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996). In the embryo, all prohemocytes express the GATA transcription factor Serpent (SRP), which is required for blood cell precursor specification and maintenance (Rehorn et al., 1996). From this pool of prohemocytes, two populations of hematopoietic cells will emerge, plasmatocytes and crystal cells (Lebestky et al., 2000). SRP participates in their differentiation and remains expressed in the differentiated blood cells (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2002). Furthermore, key lineage-specific factors are required for the differentiation into these two cell types. On the one hand, the RUNX transcription factor Lozenge (LZ) forms a functional complex with SRP to induce crystal cell formation (Waltzer et al., 2003), and in a *lz* mutant no crystal cells appear (Lebestky et al., 2000). On the other hand, the two related transcription factors Glial cells missing (GCM) and GCM2 (also known as Glide and Glide2) are jointly required for plasmatocyte differentiation (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997; Kammerer and Giangrande, 2001). In the absence of both *gcm* and *gcm2* (*gcm/gcm2*), plasmatocytes do not differentiate normally and their number is strongly reduced, whereas crystal cell formation appears unaffected (Alfonso and Jones, 2002). In addition, enforced expression

of GCM in crystal cells converts them into plasmacytes (Lebestky et al., 2000). By contrast, ectopic expression of LZ in plasmacytes induces crystal cell marker expression but does not repress plasmacyte cell fate (Waltzer et al., 2003).

It is proposed that, for their differentiation, crystal cells must express *lz* but not *gcm/gcm2*, whereas plasmacytes have to express *gcm/gcm2* but not *lz* (Lebestky et al., 2000). Interestingly, *gcm/gcm2* expression is detected from stage 5 in the hematopoietic primordium (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997), whereas the onset of *lz* expression is only detected later (at stage 10) (Lebestky et al., 2000). These observations raise several questions: (1) do the crystal cell and the plasmacytes precursors emerge from the same pool of prohemocytes; (2) when do the two populations segregate; and (3) what is the relationship between *lz* and *gcm/gcm2* during blood cell lineage choice?

To address these questions, we have undertaken an analysis of the mechanism of segregation of the two embryonic blood cell lineages. We find that *gcm* is expressed early on in all prohemocytes but is rapidly downregulated in the anterior-most cells of the hematopoietic primordium, which initiate *lz* expression by stage 7. Our results suggest that the coordinated repression of *gcm* and activation of *lz* in the anterior row of prohemocytes is a key step in the regulation of blood cell lineage choice. In the absence of both *gcm* and *gcm2*, we observe a striking increase in the number of crystal cells, indicating that *gcm/gcm2* actually regulates crystal cell development. We further show that *gcm/gcm2* inhibits crystal cell formation in two steps: first by regulating the number of cells that initiate *lz* expression, and second by interfering with *lz* maintenance in these cells. Furthermore, contrary to what has been reported during larval hematopoiesis (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003), we demonstrate that Notch signalling is neither sufficient nor required for crystal cell formation. Finally, our results indicate that prohemocytes are bipotent progenitors, and that the interplay between *gcm/gcm2* and *lz* expression dictates the cell fate choice.

Materials and methods

Fly stocks

Most *Drosophila melanogaster* lines were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center. The following strains were kindly provided by different laboratories: *uas-gcm*, *uas-gcm2*, *gcm-lacZ* (*gcm^{rA87}*), *Df(2L)200* and *Df(2L)Gcm2* (B. Jones, University, MS, USA); *uas-lz* and *lz^{R1}* (U. Banerjee, Los Angeles, CA, USA); *stg²* (M. Crozatier, Toulouse, France); *N^{55e11} FRT10.1* (A. Martinez-Arias, Cambridge, UK). *uas-srp*, *srp-gal4* and *pg33* have been previously described by Waltzer et al. (Waltzer et al., 2002). To generate *gcm*- and *gcm2*-deficient germ-line clones, males carrying *hs-flp*; *FRT40A ovo^{D1}/CyO* were crossed to *Df(2L)200 FRT40A/CyO* females. Larvae from this cross were heat shocked daily for 1 hour at 37°C for 3 days, and the emerging *Df(2L)200 FRT40A/FRT40A ovo^{D1}* adult females were crossed to *Df(2L)200/CyO (twi-lacZ)* males. *Notch* germ-line clone mutants were generated according to a similar protocol, using the *N^{55e11} FRT10.1* and the *ovo^{D1} FRT10.1*; *hs-flp* stocks.

Unless specified, crosses and embryo collections were performed at 25°C. To induce transient expression of GCM, *hs-gal4*; *uas-gcm* embryos were collected at 18°C for 3 hours, aged at 18°C for 6, 9 or 12 hours, heat shocked twice at 37°C for 20 minutes, and aged at 18°C for 16, 13 or 10 hours, respectively, before being processed for analysis.

Plasmids and transgenesis

The 1.5 kb upstream regulatory region of *lz* (nucleotides 234118 to 235562 on the genomic scaffold AE003446) was cloned into pCasper-hs43-lacZ to generate pLZ-lacZ. The corresponding P{*lz-lacZ*} transgenic lines were generated by standard P-element-mediated transformation into *w¹¹¹⁸* flies.

In situ hybridization and antibody staining

The in situ hybridization technique and probes used have been previously described by Waltzer et al. (Waltzer et al., 2003).

For double fluorescent staining, the following antibodies were used: rabbit anti-Serpent antibody (1/500) (Reuter, 1994), rabbit anti-β-GAL antibody (1/500; Cappel Pharmaceutical), goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1/400; Molecular Probes), sheep anti-DIG antibody (1/500; Roche), donkey anti-sheep antibody Alexa Fluor 488 (1/400; Molecular Probes) and/or anti-fluorescein AP (1/1000; Roche), revealed with Fast Red substrate (Vector).

Results

As a first step to elucidate the mechanisms underlying embryonic blood cell fate choice, we compared the expression patterns of the key transcription factors *srp*, *gcm* and *lz* from the earliest stage of hematopoiesis, i.e. from stage 5, when *srp* expression defines the hematopoietic anlage in the mesoderm (Rehorn et al., 1996).

gcm is initially expressed in all prohemocytes but is rapidly downregulated in crystal cell precursors

GCM and GCM2 are co-expressed transcription factors that act redundantly to induce plasmacyte differentiation (Alfonso and Jones, 2002) and that have been suggested to be plasmacyte specific (Alfonso and Jones, 2002; Lebestky et al., 2000). We investigated whether *gcm* is expressed only in a sub-population of prohemocytes that will give rise to plasmacytes or in all prohemocytes, including the prospective crystal cells. As shown Fig. 1, at stage 5 (2 hours and 10 minutes to 2 hours and 50 minutes after egg laying; AEL), *gcm* and *srp* transcripts co-localise in all of the cells that constitute the hematopoietic primordium (Fig. 1A). *gcm2* is also expressed in the hematopoietic anlage from stage 5, but at a much lower level than *gcm* (Alfonso and Jones, 2002), therefore precluding the precise analysis of its expression domain by fluorescent in situ hybridization. Interestingly, at stage 6 (2 hours and 50 minutes to 3 hours AEL), *gcm* transcripts are no longer detected in the anterior-most row of *srp*-expressing cells (Fig. 1B). We extended this observation by comparing the localisation of the *gcm* transcripts with that of the SRP protein (Fig. 1C). Thus, although *gcm* is initially expressed in all prohemocytes, its expression is subsequently downregulated in a sub-population of prohemocytes.

To confirm that *gcm* is also expressed in the crystal cell precursors, we analysed the expression of the P{*lacZ*} insertion in *gcm* (*gcm^{rA87}*), previously shown to recapitulate *gcm* expression (Bernardoni et al., 1997). Taking advantage of the long half-life of β-gal, we observed that almost all of the crystal cells (*DoxA3*-positive cells) co-expressed β-gal by stage 11 (Fig. 1K). However, β-gal staining diminished progressively in the crystal cell population at later stages (Fig. 1L,M). For comparison, SRP (Lebestky et al., 2000) or *srp-gal4/uas-lacZ* expression is maintained in crystal cells throughout embryogenesis (Fig. 1N). Hence, although *gcm* is

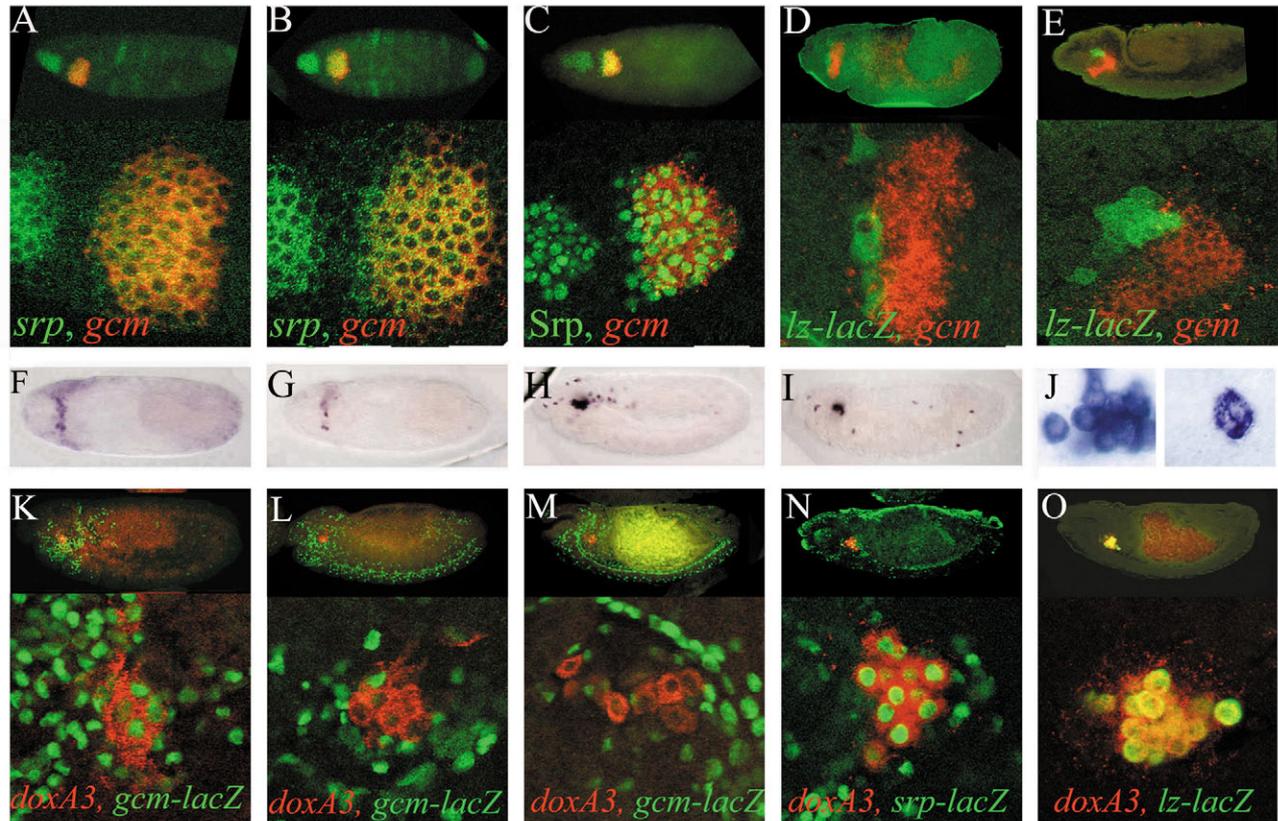


Fig. 1. The downregulation of *gcm* precedes the induction of *lz* in the anterior-most row of prohemocytes. (A,B) *gcm* (red) and *srp* (green) transcription in stage 5 (A) or stage 6 (B) embryos. (C) *gcm* transcript (red) and SRP protein (green) expression in stage 6 embryo. (D,E) *lz-lacZ* embryo processed to reveal *gcm* transcript (red) and β -gal protein (green) at stage 7 (D) and at stage 10 (E). (F-J) *lacZ* expression in *lz-lacZ* (F) or *lz-gal4/uas-gal4; uas-gal4/+; uas-gal4/uas-lacZ* (G-J) embryos at stage 7 (F,G, ventral views), stage 11 (H, side views) or stage 14 (I, side views). (J) High magnification views of *lacZ*-expressing cells localised in the crystal cell cluster (left panel) or far from the cluster (right panels) in a stage 14 *lz-gal4/uas-gal4; uas-gal4/+; uas-gal4/uas-lacZ* embryo. (K-M) Side views of *gcm-lacZ* embryos processed to reveal *DoxA3* mRNA (red) and β -gal protein (green) at stage 11 (K), 14 (L) or 15 (M). (N,L) Side views of *DoxA3* mRNA (red) and β -gal protein (green) in *srp-Gal4;uas-lacZ* (N) or *lz-lacZ* (O) embryos at stage 15. Contrary to *lz-lacZ* or *srp-lacZ*, *gcm-lacZ* expression is progressively lost in the crystal cells during embryogenesis: 26 out of the 28 *DoxA3*⁺ cells are *gcm-lacZ*⁺ at stage 11 (K), against 9 out of 27 at stage 14 (L) and 0 out of 27 at stage 15 (M). *lz-lacZ* codes for a cytoplasmic β -gal whereas *gcm-lacZ* and *uas-lacZ* code for a nuclear β -gal.

initially expressed in all prohemocytes, it is rapidly repressed in the crystal cell precursors. Thus, the transcriptional downregulation of *gcm* in the presumptive crystal cell progenitors (and its maintenance in the remaining prohemocytes) is the earliest known manifestation of a blood cell-lineage choice.

***lz* expression is induced by stage 7 in the anterior subpopulation of prohemocytes that has downregulated *gcm* expression**

lz activity is required for crystal cell formation (Lebestky et al., 2000). Using direct in situ hybridization and immunostaining, it was shown that *lz* is weakly expressed in the crystal cell precursors from stage 10 (4 hours and 20 minutes to 5 hours and 20 minutes AEL). However, our results with *gcm* suggest that the initial blood cell lineage choice takes place at around stage 6, one hour earlier than the reported *lz* expression. Because low levels of expression might hinder *lz* detection during the early stages of hematopoiesis, we re-assessed the onset of *lz* expression by different means. First, we made use of the *lz-gal4* enhancer-trap line that recapitulates *lz* expression

(Lebestky et al., 2000). By generating an auto-amplification loop with three copies of *uas-gal4* transgenes (Hassan et al., 2000), we observed *lacZ* expression as early as stage 7 (3 hours to 3 hours and 10 minutes AEL; Fig. 1G). In parallel, we generated transgenic lines containing different regulatory regions of *lz* cloned upstream of a *lacZ* reporter gene. Similarly, we found that a 1.5 kb-long *lz*-upstream region drove *lacZ* expression from stage 7 in a row of prohemocytes and, subsequently, in differentiated crystal cells (Fig. 1F,O). Remarkably, the *lz-lacZ*-expressing cells are not homogeneously distributed among the prohemocyte population but comprise the anterior-most row of cells in which *gcm* transcripts are no longer detected (Fig. 1D,E). It thus appears that *lz* expression is induced by stage 7 in a specific domain of the hematopoietic anlage that corresponds to the domain where *gcm* expression is lost.

Two fates for *lozenge*-expressing cells: crystal cells and plasmatocytes

Crystal cell precursors differentiate into two bilaterally symmetrical groups of cells that remain localised around the

Table 1. The fate of cells that initiate *lz* expression

	Wild type (<i>n</i> =26)		<i>gcm</i> ^{N7-4} (<i>n</i> =15)		<i>Df(2L)200</i> (<i>n</i> =14)	
	Clustered	Scattered	Clustered	Scattered	Clustered	Scattered
<i>lz</i> ⁺ cells (<i>lz-gal4;uas-lacZ</i> ⁺)	27 (±4.4)	17.2 (±5.6)	53.8 (±5.6)	42.5 (±7.8)	53.2 (±6.0)	43.4 (±10.3)
% Clustered	61%		56%		55%	
% Scattered		39%		44%		45%
<i>doxA3</i> ⁺ cells	27 (±4.4)	1.7 (±1.3)	53.8 (±5.6)	9.6 (±3.4)	53.2 (±6.0)	39.9 (±11.8)
% of differentiation (<i>doxA3</i> ⁺)/(<i>lz</i> ⁺)	100%	10%	100%	23%	100%	92%

proventriculus (Lebestky et al., 2000). In the course of our experiments with the *uas-gal4* amplification system, we noticed that some *lz-gal4/uas-lacZ*-positive cells were localized outside the crystal cell clusters (Fig. 1H,I) and did not express *DoxA3* (Fig. 3E), suggesting that not all the cells that initiate *lz* expression differentiate into crystal cells. This enticed us to investigate the fate of all of the cells that initiate *lz* expression (so-called *lz*⁺ progenitors). As shown in Table 1, by stage 14, 60% of the marked cells are clustered along the proventriculus and co-express the crystal cell marker *DoxA3*. The remaining 40% are scattered throughout the embryo, lack the expression of crystal cell-specific markers and morphologically resemble macrophages (Fig. 1J). Therefore, only a fraction of the *lz*⁺ progenitors differentiates into crystal cells, while the rest become plasmatocytes. These data, together with the observation that *gcm* is initially expressed in all prohemocytes and is required for plasmatocyte

differentiation (Alfonso and Jones, 2002; Kammerer and Giangrande, 2001), led us to re-assess the role of *gcm/gcm2* during blood cell lineage choice.

Crystal cell development is repressed by GCM and GCM2

To address the possible role of *gcm* and *gcm2* during crystal cell development, we first analysed the phenotype of embryos carrying a deficiency that removes both genes (*Df(2L)200*) (Alfonso and Jones, 2002). In *Df(2L)200* mutant embryos, we observed a striking increase in the size of the crystal cell clusters and the presence of numerous ectopic *DoxA3*-expressing cells scattered throughout the embryo (Fig. 2B,D compare with 2A,C). Similar results were obtained when we analysed the expression of other crystal cell markers, such as *CG5579* and *CG8193*. These results were confirmed with a smaller deficiency (*Df(2L)Exel7042*) that also removes

gcm and *gcm2* (data not shown). Morphological observation strongly suggested that these *DoxA3*⁺ cells are crystal cells (Fig. 2F), despite the ectopic localisation of some of them. Furthermore, these cells efficiently melanised in a *Bc* mutant context and were not observed in a *lz* mutant background (Fig. 2G,I). Thus, in sharp contrast to previous reports (Alfonso and Jones, 2002; Lebestky et

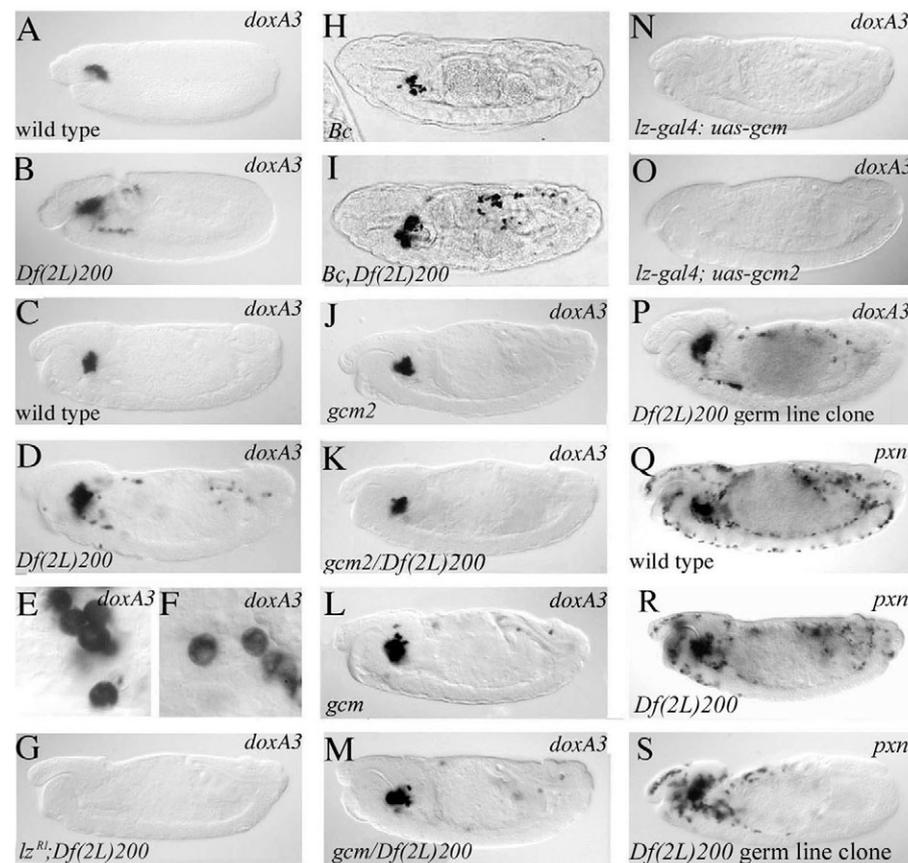


Fig. 2. GCM and GCM2 inhibit crystal cell formation. (A–D) Side views of *DoxA3* expression in stage 11 (A,B), or 15 (C,D) embryos. (A,C) Wild-type embryos; (B,D) *Df(2L)200* embryos. (E,F) Higher magnification views of *DoxA3*-expressing cells located in the crystal cell cluster in a wild-type embryo (E), or located ectopically in a *Df(2L)200* embryo (F). (G) Side views of *DoxA3* expression in a *lz*^{R1};*Df(2L)200* mutant embryo at stage 15. (H,I) Side views of stage 17 embryos carrying the *Bc*¹ mutation that induces spontaneous melanisation of the crystal cells. (H) *Bc*¹, (I) *Bc*¹;*Df(2L)200*. (J–P) Side views of *DoxA3* expression in stage 15 embryos. (Q–S) Side views of *Pxn* expression in stage 15 embryos. Genotypes as indicated in the lower part of each panel.

al., 2000), our data indicate that *gcm* and *gcm2* normally inhibit crystal cell development.

To ensure that the above phenotypes were due to the lack of *gcm* and/or *gcm2* but not to another gene deleted by the deficiencies, we also examined the phenotypes of *gcm* or *gcm2* single mutants. Lack of *gcm* resulted in a marked increase in the number of crystal cells (Fig. 2L, Table 1), whereas lack of *gcm2* alone did not significantly affect their development (Fig. 2J). The phenotypes were not enhanced when a *gcm* or *gcm2* mutation was combined with *Df(2L)200* (Fig. 2K,M). Nonetheless, the strongest phenotype was observed when both *gcm* and *gcm2* were deleted (Fig. 2D, Table 1). These results indicate that *gcm* is primarily responsible for inhibiting crystal cell development, and that its lack of function can be partially compensated for by *gcm2*. To verify that *gcm2* is also able to inhibit crystal cell fate, we overexpressed *gcm2* in crystal cell precursors. Similar to what was shown for GCM (Lebestky et al., 2000) (Fig. 2N), *lz-gal4*-driven expression of GCM2 inhibited crystal cell formation (Fig. 2O). Thus, both *gcm* and *gcm2* are capable of inhibiting crystal cell formation.

Comparison between the expression patterns of the crystal cell-specific marker *DoxA3* and the panhemocyte marker *peroxidase* (*Pxn*) (Nelson et al., 1994) indicated that most hemocytes do not acquire the crystal cell fate in *gcm/gcm2* mutant embryos (Fig. 2D, compared with 2R). Thus, in a *Df(2L)200* mutant embryo, it was shown previously that there are approximately 250 PXN-labeled cells (Alfonso and Jones, 2002), whereas we observed about 90 crystal cells, and 40% of them were mislocated (Table 1). Because some *gcm* activity is maternally contributed (Bernardoni et al., 1997), we wondered whether this might explain why only some prohemocytes adopt a crystal cell fate or some crystal cells migrate. However, even in embryos derived from *Df(2L)200* germline clones, ectopic crystal cells were still present (Fig. 2P) and most hemocytes did not differentiate as crystal cells (Fig. 2S). Thus, although *gcm* and *gcm2* inhibit crystal cell development, their absence is not sufficient to cause a complete switch in the fate of the hematopoietic precursors from plasmatocytes to crystal cells.

GCM and GCM2 inhibit crystal cell formation by a two-step process

Next, we tried to understand how *gcm* and *gcm2* control crystal cell fate. As downregulation of *gcm* in the anterior row of prohemocytes shortly precedes *lz* activation, we investigated whether *lz* activation was modified in the absence of *gcm* and *gcm2*. On monitoring *lz-lacZ* expression in stage 7 embryos (i.e. before proliferation resumes), we observed more *lz*⁺ progenitors in the *Df(2L)200* mutant embryos than in wild type (Fig. 3B). Interestingly, all the *lz*⁺ progenitors remained localised to the anterior of the hematopoietic domain, indicating that *lz* induction is still spatially restricted. Thus, in the absence of *gcm/gcm2* there is an increase in the size of the prohemocyte subpopulation that initiates *lz* expression.

We next analysed the fate of the *lz*⁺ progenitors. In stage 14 embryos, we observed a large increase in the number of *lz-gal4/uas-lacZ*-expressing cells in the absence of *gcm/gcm2* (Table 1, Fig. 3D). Double labelling indicated that almost all of the *lz-gal4/uas-lacZ*-expressing cells, even those scattered throughout the embryo, co-expressed the crystal cell marker *DoxA3* (Table 1, Fig. 3F). This is in marked contrast with the wild-type situation, where only the *lz-gal4/uas-lacZ* cells located around the proventriculus express *DoxA3* (Table 1, Fig. 3E). Thus, in the absence of *gcm/gcm2*, all the *lz*⁺ progenitors, both those that remain near the proventriculus and those that migrate to distant positions, differentiate into crystal cells.

To ensure that the increase in crystal cells was directly related to a rise in the number of *lz*⁺ progenitors and not to a modification of the proliferation program, we determined the number of crystal cells formed in the absence of cell proliferation. Accordingly, we introduced the *string* (*Drosophila cdc25*) mutation, which blocks all post-blastodermal cell divisions (Edgar and O'Farrell, 1990), and monitored the number of crystal cells formed in wild-type or in *Df(2L)200* mutant embryos. Even in a *string* mutant context, lack of *gcm/gcm2* induced a twofold increase in the number of crystal cells (Fig. 3, compare G with H).

In summary, the absence of *gcm/gcm2* results in an increase in the number of *lz*⁺ progenitors and allows all of them to

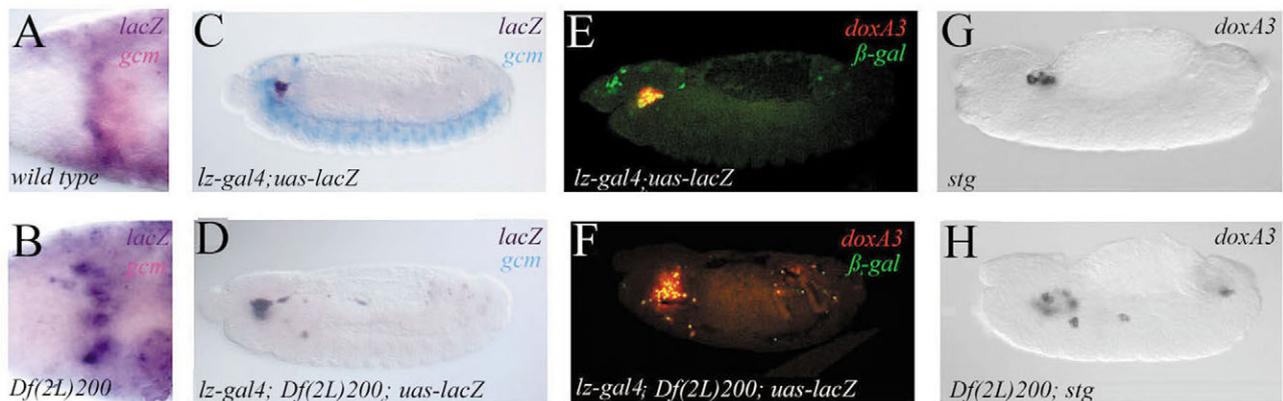


Fig. 3. GCM/GCM2 regulates both the number of *lz*⁺ progenitors and their subsequent differentiation. (A,B) *gcm/gcm2* restricts *lz* activation in the prohemocytes. Ventral views of *lacZ* (dark purple) and *gcm* (red) transcripts in stage 7 *lz-lacZ* (A) and *Df(2L)200; lz-lacZ* (B) embryos. (C–F) *gcm/gcm2* inhibits the differentiation of the *lz*⁺ progenitors into crystal cells. Side views of stage 13 *lz-gal4; uas-lacZ* (C,E) and *lz-gal4; Df(2L)200; uas-lacZ* (D,F) embryos showing *lacZ* (dark purple) and *gcm* (blue) transcripts (C,D), or β -gal (green) and *DoxA3* (red) expression (E,F). (G,H) The lack of *gcm/gcm2* induces an increase in the number of crystal cells even in the absence of cell proliferation. Side view of *DoxA3* expression in *stg*² (G) and *Df(2L)200; stg*² (H) stage 13 embryos.

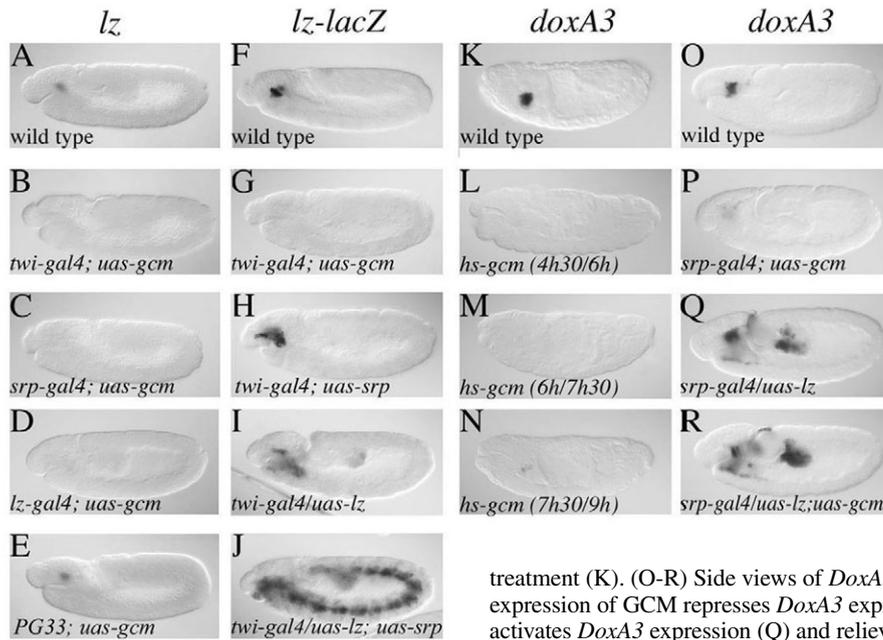


Fig. 4. GCM inhibits *lz* induction and maintenance but not LZ activity. (A-E) Side views of *lz* expression in stage 11 embryos. (A) Wild type. *lz* expression is repressed by GCM when *gcm* expression is driven in the whole mesoderm (B), the hemocytes (C) or the prospective crystal cells (D), but not when it is overexpressed in the plasmatocytes (E). (F-J) Side views of *lz-lacZ* expression in stage 11 embryos. *lz-lacZ* transcription is repressed upon overexpression of GCM in the mesoderm (G). Pan-mesodermal expression of SRP (H) or LZ (I) induces restricted activation of *lz-lacZ*, whereas co-expression of LZ and SRP (J) induces synergistic activation throughout the mesoderm. (K-N) Side views of *DoxA3* expression in stage 16 embryos. Crystal cell formation is repressed by heat-shock induced transient expression of GCM around stage 10 (L), 11 (M) or 12 (N). No repression was observed in the absence of heat-shock treatment (K). (O-R) Side views of *DoxA3* expression in stage 11 embryos. *srp-gal4*-driven expression of GCM represses *DoxA3* expression (P). *srp-gal4*-driven expression of LZ activates *DoxA3* expression (Q) and relieves GCM-induced repression upon *DoxA3* (R).

differentiate into crystal cells. These data suggest that *gcm* and *gcm2* inhibit crystal cell differentiation by a two-step process. First, they limit the induction of *lz* expression to a subset of prohemocytes, thereby regulating the number of crystal cell precursors. Second, they inhibit the acquisition of the crystal cell fate in 40% of the *lz*⁺ progenitors, which take on a plasmatocyte fate instead.

Activation and maintenance of *lz* are inhibited by GCM and GCM2

The preceding results suggested that *gcm* represses *lz* expression. To test this hypothesis, we performed a gain-of-function analysis using the *uas/gal4* system. Interestingly, GCM (and GCM2, data not shown) repressed *lz* when it was expressed throughout the mesoderm (*twi-gal4*), in the entire hemocyte population (*srp-gal4*) or in the presumptive crystal cells (*lz-gal4*) (Fig. 4B-D). Similar results were obtained when we monitored the more robust *lz-lacZ* expression instead of *lz*. (Fig. 4G). By contrast, *lz* expression was not affected when GCM was expressed under the control of the plasmatocyte-specific driver *pg33* (Fig. 4E) (Waltzer et al., 2003). Thus *gcm* and *gcm2* can repress *lz* expression in a cell-autonomous manner.

All of the cells initiating *lz* expression differentiate into crystal cells in the absence of *gcm/gcm2*, whereas 40% of them do not in a wild-type situation. To address the possibility, that *gcm* also inhibits the maintenance of *lz*, we induced *gcm* overexpression at different times during embryogenesis using a *hs-gal4* driver (see Materials and methods for details). Interestingly, transient ectopic expression of GCM around stage 9, 10 or 11 still repressed crystal cell formation (Fig. 4L-N). Therefore *gcm* probably also inhibits the maintenance of *lz* expression.

As *lz* expression must be maintained for crystal cell differentiation (Lebestky et al., 2000), we wondered whether *lz* expression might be auto-activated. Reminiscent of its capacity to induce ectopic crystal cell markers (Waltzer et al.,

2003), *twi-gal4*-driven LZ expression activated *lz-lacZ* in the *srp*-expressing domains (Fig. 4I). Indeed, SRP and LZ form a functional complex to induce crystal cell development (Waltzer et al., 2003). Therefore we ascertained whether they also cooperate to regulate *lz* expression. Whereas we observed restricted ectopic activation of *lz-lacZ* by SRP or LZ alone (Fig. 4H,I), *lz-lacZ* was strongly activated throughout the mesoderm when SRP and LZ were co-expressed (Fig. 4J). Thus SRP and LZ cooperate to maintain *lz* expression via a positive-feedback loop.

If *gcm* (and *gcm2*) antagonizes crystal cell development only by repressing *lz* expression, we surmised that we might rescue crystal cell formation by uncoupling *lz* expression from *gcm* regulation. Accordingly, we co-expressed LZ and GCM under the control of the *srp-gal4* driver and monitored crystal cell marker expression. As shown in Fig. 4, LZ induced *DoxA3* expression to a similar extent in the presence or in the absence of overexpressed GCM, indicating that GCM does not inhibit LZ function (compare Fig 4Q with 4R). All together, these data demonstrate that *gcm* and *gcm2* repress crystal cell formation by inhibiting both the induction and the maintenance of *lz* transcription.

Notch signalling is not required for crystal cell formation in the embryo

During larval hematopoiesis, Notch signalling in the lymph gland is required and is sufficient to induce crystal cell formation (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003). Furthermore, the number of crystal cells is decreased in a *Notch* mutant embryo, suggesting that Notch signalling might also be required for embryonic crystal cell formation (Lebestky et al., 2003). Since the remaining crystal cells in a *Notch* mutant might reflect Notch maternal contribution (Lebestky et al., 2003), we generated *Notch* mutant germ line clones. We still observed crystal cells, both in embryos derived from *Notch* germline clones (12.8±2.6 crystal cells; n=21) and in *Notch* zygotic mutants (15.9±3.5 crystal cells; n=19; Fig. 5B,C).

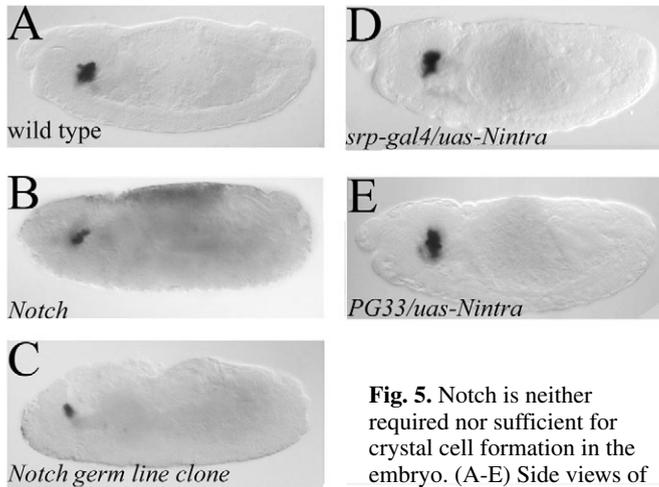


Fig. 5. Notch is neither required nor sufficient for crystal cell formation in the embryo. (A-E) Side views of *DoxA3* expression in stage 14 embryos. (A) Wild type; (B) N^{55e11} zygotic mutant; (C) N^{55e11} germ-line clone mutant; (D) *srp-gal4;uas-N^{intra}*; (E) *pg33;uas-N^{intra}*.

Therefore, although Notch participates in embryonic crystal cell development, it is clearly not required. To test whether ectopic Notch signalling activates crystal cell formation in the embryo, we expressed an activated form of Notch in all of the prohemocytes using the *srp-gal4* driver or in plasmatocytes

using the *pg33* driver. In neither case did we observe more crystal cells (Fig. 5D,E). Therefore, contrary to the previous suggestion (Lebestky et al., 2003), we show that Notch signalling is neither sufficient nor required to induce crystal cell formation in the embryo.

Prohemocytes are bipotential hematopoietic progenitors

In a *gcm/gcm2* mutant background, as in wild type, only a fraction of the prohemocytes develops into crystal cells. In addition, unlike *gcm*, which can convert crystal cells into plasmatocytes (Lebestky et al., 2000), ectopic expression of *lz* induced crystal cell marker expression without repressing plasmatocyte differentiation (Waltzer et al., 2003) (Fig. 6C,G,K). This raised the question: do all prohemocytes have the ability to develop as bona fide crystal cells? To address this issue, we expressed *lz* in all of the prohemocytes in a *gcm/gcm2* mutant background with the *srp-gal4* driver and monitored hemocyte differentiation. Under these conditions, almost all of the hemocytes remained around the proventriculus, judging by the expression of the hemocyte marker *Pxn* (Fig. 6H). Furthermore, all the hemocytes expressed high levels of crystal cell-specific markers and morphologically resembled differentiated crystal cells (Fig. 6D,L). Thus, in the absence of *gcm/gcm2*, *lz* is capable of inducing differentiation of all the prohemocytes into crystal cells. In conclusion, these results strongly support the hypothesis that prohemocytes are

bipotential hematopoietic progenitors that can differentiate either into plasmatocytes or into crystal cells depending on the respective activity states of *gcm/gcm2* and *lz*.

Discussion

We have taken advantage of the relatively simple model provided by *Drosophila* embryonic hematopoiesis to attempt to unravel the mechanisms that underlie the choice of two blood cell fates in vivo. Our data indicate that crystal cells and plasmatocytes develop from a pool of bipotential hematopoietic progenitors. We show that the earliest detectable manifestation of the segregation of the two blood cell lineages occurs in the anterior row of prohemocytes with the downregulation of *gcm* and the induction of *lz*. Furthermore, we demonstrate that the number of *lz*-expressing precursors, and their final differentiation into crystal cells or plasmatocytes, is regulated by *gcm/gcm2* activity, which inhibits *lz* induction and maintenance. Thus, embryonic blood cell lineage segregation is revealed to be a highly dynamic process in which the interplay between the transcription factors *gcm/gcm2* and *lz* plays a crucial role.

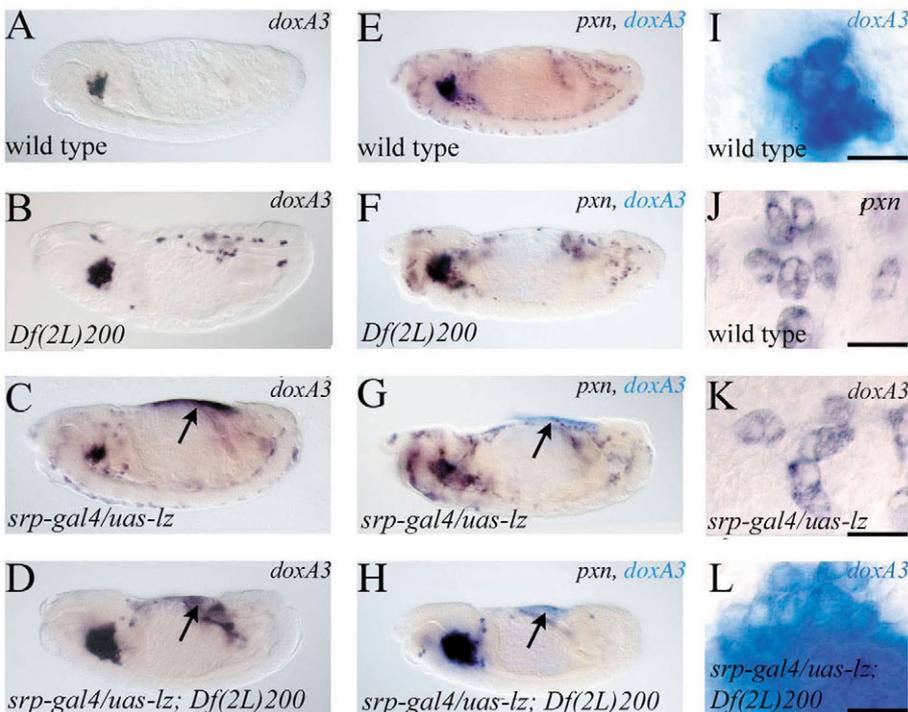


Fig. 6. All the prohemocytes have the capability to develop as crystal cells. (A-H) Side views of stage 14 to 15 embryos processed to reveal *DoxA3* (A-D), or *DoxA3* (blue) and *Pxn* (black) expression (E-H). The arrows in C,D,G and H point to the ectopic activation of *DoxA3* expression in the amnioserosa upon *srp-gal4*-induced expression of *uas-lz* in this tissue. (I-L) Higher magnification views of wild-type crystal cells expressing *DoxA3* (I), wild-type plasmatocytes expressing *Pxn* (J), and *DoxA3*-expressing hemocytes upon *srp*-driven expression of *LZ* in a wild-type embryo (K) or in a *Df(2L)200* embryo (L). Scale bar in I-L: 12 μ m.

***gcm/gcm2* play a pivotal role in the plasmacyte versus crystal cell developmental decision during embryonic hematopoiesis**

It was shown previously that *gcm* and *gcm2* are required for the proper differentiation of plasmacytes, and GCM and GCM2 were claimed to be plasmacyte-specific lineage transcription factors that are not involved in crystal cell development (Alfonso and Jones, 2002; Lebestky et al., 2000). By contrast, our results clearly demonstrate that *gcm* and *gcm2* inhibit crystal cell formation. Furthermore, we detected the expression of *gcm* in all of the prohemocytes, including the prospective crystal cell precursors, at stage 5, a result confirmed by tracing *gcm-lacZ* expression into early differentiating crystal cells. Thus, *gcm* and *gcm2* participate in blood cell fate segregation by regulating not only plasmacyte development but also that of crystal cells.

gcm and *gcm2* have been most intensively studied during neurogenesis, where they are required to promote glial cell development at the expense of neuronal cell fate (Van De Bor and Giangrande, 2002). We show here that they also regulate a binary cell fate choice during hematopoiesis. However, although their expression is restricted to glial precursors during neurogenesis (Alfonso and Jones, 2002; Kammerer and Giangrande, 2001; Vincent et al., 1996), they are initially expressed in all prohemocytes irrespective of their subsequent fate. Furthermore, in the absence of *gcm/gcm2*, whereas almost all presumptive glial cells are transformed into neurons (Alfonso and Jones, 2002; Kammerer and Giangrande, 2001; Vincent et al., 1996), only a small proportion of the presumptive plasmacytes adopts a crystal cell fate. Therefore, the function and mechanism of action of *gcm/gcm2* in regulating cell fate choice during neurogenesis and hematopoiesis are different.

***gcm* and *gcm2* interfere with crystal cell development at different levels**

We have deduced that *gcm* and *gcm2* control crystal cell formation by a two-step process. First, *gcm/gcm2* determines the number of crystal cell precursors by restricting the initiation of *lz* expression in the prohemocyte population (Fig. 7). In the absence of *gcm/gcm2*, we observed more *lz*⁺ progenitors, correlating with a greater number of differentiated crystal cells at later stages. Our data indicate that *gcm* is expressed early in the entire hematopoietic primordium but is rapidly downregulated in the prospective *lz* expression domain. Maintaining GCM or GCM2 expression in the *lz*⁺ progenitors inhibited crystal cell differentiation. Thus, repressing *gcm/gcm2* expression in the anterior population of prohemocytes is most probably a prerequisite for the emergence of crystal cells.

Second, *gcm* and *gcm2* regulate the proportion of *lz*⁺ progenitors that ultimately differentiate in crystal cells: whereas 40% of these cells differentiate into plasmacytes in wild-type embryos, all of them become crystal cells in the absence of *gcm/gcm2*. Lebestky et al. already noted that some *lz*-expressing cells differentiate into plasmacytes and suggested that this might be due to the de novo activation of *gcm* expression in these cells (Lebestky et al., 2000). Our results extend their observations and demonstrate that *gcm* participates in this process, although it is not re-expressed in the *lz*⁺ cells. Our data further suggest that the residual *gcm*

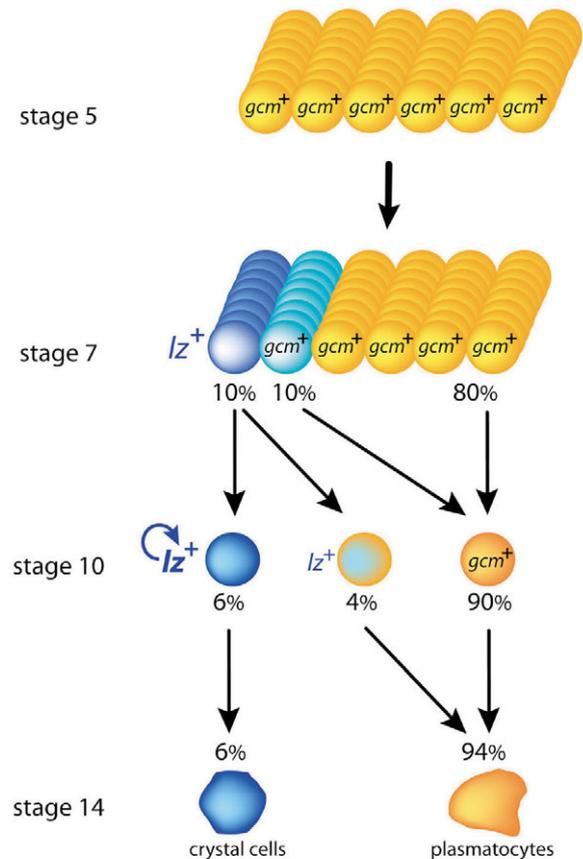


Fig. 7. Schematic representation of blood cell fate resolution during *Drosophila* embryogenesis. Initially all the prohemocytes express *gcm* but not *lz*. Then *gcm* transcription is turned off and *lz* expression activated in the first row of prohemocytes but not in the others that subsequently differentiate into plasmacytes. 60% of these *lz*⁺ progenitors manage to maintain *lz* expression through an autoactivation loop and differentiate into crystal cells, while in the remaining 40%, the presence of residual GCM interferes with *lz* expression and promotes plasmacyte differentiation. In the absence of *gcm/gcm2*, more prohemocytes (potentially the second row) initiate *lz* expression and all the *lz*⁺ progenitors differentiate into crystal cells.

activity present in the *lz*⁺ progenitors may contribute to the relative plasticity in the fate of these progenitors, allowing some of them to differentiate into plasmacytes. In summary, we provide compelling evidence that *gcm* and *gcm2* play a key role in regulating cell fate choice in prohemocytes and *lz*⁺ progenitors.

The modulation of *lz* expression controls crystal cell formation

Our study yields new insight into the regulation and mode of action of *lz* during embryonic crystal cell development. Although plasmacytes migrate through the embryo, crystal cells gather around the proventriculus. Strikingly, we showed that in the absence of *gcm/gcm2*, *srp*-driven high-level expression of *lz* induced the transformation of all of the hemocytes to authentic crystal cells that remain clustered. By contrast, when *lz* is expressed under the control of its own promoter, 40% of *lz*⁺ cells migrate through the embryo whether

or not they express *gcm/gcm2*. Hence, our data suggest that high levels of *lz* are required for crystal cell clustering and that *lz* induction in prohemocytes is heterogeneous. Below a certain threshold, *lz*⁺ progenitors retain the default migratory behaviour of hemocytes and, in the presence of *gcm/gcm2*, can differentiate into plasmacytes. It is noteworthy that *gcm/gcm2* participate in (but are not required for) hemocyte migration (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997). Thus, *lz* and *gcm/gcm2* appear to have opposite effects on blood cell migration, with *gcm/gcm2* promoting a migratory behaviour that dominates the inhibitory effect of *lz*.

It has been shown that *lz* function is continuously required to promote crystal cell development (Lebestky et al., 2000). Here, we have identified an enhancer of *lz* that is transactivated by the SRP/LZ complex. This observation suggests that, once initiated, *lz* expression can be maintained by a positive autoregulatory feedback loop, thereby providing a simple mechanism to stabilise crystal cell lineage commitment. This enhancer contains several RUNX-binding sites and we are currently investigating the role of these sites in *lz* autoregulation. Interestingly, the three mammalian homologues of the RUNX factor LZ contain several conserved RUNX-binding sites in their promoters (Otto et al., 2003). Furthermore, RUNX2 maintains its own expression through an auto-activation loop in differentiated osteoblasts (Ducy et al., 1999), whereas RUNX3 inhibits *RUNX1* expression in B lymphocytes (Spender et al., 2005). Thus, auto- or cross-regulation might be a common feature of the *RUNX* family. In addition, we showed that GCM/GCM2 repress *lz* expression. However, no consensus GCM-binding sites are present in the *lz* crystal cell-specific enhancer. Interestingly, it was recently shown that zebrafish *gcm* is expressed in macrophages (Hanaoka et al., 2004). Yet, the putative functions of the two *gcm* homologues and their possible interplays with RUNX factors have not been investigated during vertebrate hematopoiesis.

Triggering blood cell fate choice

Because *gcm* is expressed early in the entire hematopoietic anlage, it is tempting to speculate that prohemocytes are primed to differentiate into plasmacytes (i.e. macrophages). Thus, it appears likely that *Drosophila* blood cells progenitors are not 'naïve'. Similarly, mammalian stem and progenitor blood cells express low levels of lineage-affiliated genes and it has been suggested that they are primed for differentiation (Graf, 2002). Furthermore, from an evolutionary perspective, macrophages are certainly the oldest and most pervasive blood cell type (Lichanska and Hume, 2000), and it is remarkable that another hematopoietic cell type may have evolved from this lineage through the use of a conserved RUNX transcription factor.

Acquisition of crystal cell fate involves both the repression of the primary fate (i.e. repression of *gcm*) and the activation of *lz*. Our data show that these two steps are coordinated in space and time. Nonetheless, the induction of *lz* is not the mere consequence of relieving *gcm/gcm2*-mediated repression of *lz* but requires an active and localised process. How *gcm* transcription is repressed and *lz* activated in the anterior row of prohemocytes is currently unknown. In the lymph gland, Notch/Serrate signalling is necessary and sufficient to induce crystal cell formation by activating *lz* expression (Duvic et al.,

2002; Lebestky et al., 2003). However our results demonstrate that, contrary to the situation in larvae, Notch is not required for crystal cell formation in the embryo. In this respect, it is interesting to note that neither *gcm* nor *gcm2* is expressed in the lymph gland (B.A., unpublished). Hence, the process that segregates crystal cells from plasmacytes relies on different mechanisms in the embryo and in the larval lymph gland. Similarly, in vertebrates, primitive and definitive hematopoiesis may also depend on partially distinct programs (Shepard and Zon, 2000). For instance, in mouse, the transcription factor PU.1 plays an essential role in the emergence of definitive macrophages but does not seem to be required for the formation of primitive macrophages in the yolk sac (Lichanska et al., 1999).

The coincident repression of *gcm* and activation of *lz* between stages 6 and 7 in a row of prohemocytes is remarkable, as it suggests that the head mesoderm is delicately patterned at this early stage of development. The hematopoietic primordium is located in the posterior head region, whose patterning involves several genes including *buttonhead*, *empty spiracles*, *orthodenticle* and *collier* (Crozatier et al., 1999). However, mutations of these genes do not specifically suppress crystal cell or plasmacyte development (L.B., unpublished). Further work will thus be required to understand the coordination permitting the silencing of *gcm* and the activation of *lz* that triggers the choice of one fate at the expense of the other.

Resolving blood cell fate choice

It was shown that *gcm* can induce the differentiation of all of the prohemocytes into plasmacytes (Lebestky et al., 2000). The data presented here demonstrate that, in the absence of *gcm/gcm2*, *lz* can transform all of the hemocytes to crystal cells. Thus, *Drosophila* prohemocytes are bipotent progenitors. However, the incapacity of *lz* to repress *gcm* (and thereby plasmacyte fate) implies that the resolution of cell fate choice does not rely on reciprocal antagonism between two 'lineage-specific' transcription factors like between GATA1 and PU.1 during myeloid/erythroid cell fate choice in vertebrates (Galloway et al., 2005; Graf, 2002; Rhodes et al., 2005). Instead, we propose that *Drosophila* embryonic blood cell fate segregation is a process that can be divided into two consecutive phases (Fig. 7). A local cue triggers the process by downregulating *gcm* and activating *lz* in the anterior population of prohemocytes, whereas *gcm* expression is maintained in the remaining cells, which differentiate into plasmacytes. Then, in the *lz*⁺ progenitors, the relative levels of LZ and GCM will dictate lineage choice. If the ratio of LZ to GCM is high enough to overcome GCM-mediated repression of *lz* expression, LZ can elicit its autoregulatory activation loop and the progenitor will differentiate into a crystal cell. If not, GCM inhibits *lz* autoactivation and the progenitor differentiates into a plasmacyte. Such a mechanism of segregation could provide some plasticity, because the size of a population may be regulated at different times by physiological cues influencing either the initiation event or the feed-back loop required for its development.

In conclusion, our data shed light on the transition in vivo from bipotent hematopoietic progenitors to lineage-restricted precursors. Interestingly, the embryonic *Drosophila* cell fate choice occurs through an original mechanism distinct from that observed during larval hematopoiesis. Moreover, this process

does not seem to involve reciprocal negative regulation between two 'lineage-specific' transcription factors. Hence, the mechanisms leading to the resolution of hematopoietic lineages in vivo appears to be more complex and diverse than expected.

We are grateful to J. Smith and members of the CBD for critically reading the manuscript, and to M. Tauzin for her help. We thank B. Ronsin and the IFR109 imaging platform. We also thank U. Banerjee, R. Reuter, A. Giangrande and B. Jones for reagents and fly stocks. This work was supported by grants from the CNRS and ARC. G.F. is supported by a post-doctoral fellowship from the ARC.

References

- Alfonso, T. B. and Jones, B. W. (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with *glial cells missing* for macrophage development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **248**, 369-383.
- Bernardoni, R., Vivancos, B. and Giangrande, A. (1997). *glide/gcm* is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev. Biol.* **191**, 118-130.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibsouda, S. and Vincent, A. (1999). Head versus trunk patterning in the *Drosophila* embryo; *collier* requirement for formation of the intercalary segment. *Development* **126**, 4385-4394.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS Biol.* **2**, E196.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M. and Karsenty, G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* **13**, 1025-1036.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M. and Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr. Biol.* **12**, 1923-1927.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H. (1990). The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* **62**, 469-480.
- Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev. Cell* **5**, 673-690.
- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H. and Schulz, R. A. (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7342-7347.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S. H. and Schulz, R. A. (2003). Combinatorial interactions of Serpent, Lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11451-11456.
- Galloway, J. L., Wingert, R. A., Thisse, C., Thisse, B. and Zon, L. I. (2005). Loss of Gata1 but not Gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Dev. Cell* **8**, 109-116.
- Graf, T. (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* **99**, 3089-3101.
- Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T. and Okamoto, H. (2004). Zebrafish *gcmB* is required for pharyngeal cartilage formation. *Mech. Dev.* **121**, 1235-1247.
- Hassan, B. A., Bermingham, N. A., He, Y., Sun, Y., Jan, Y. N., Zoghbi, H. Y. and Bellen, H. J. (2000). *atonal* regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron* **25**, 549-561.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* **130**, 4955-4962.
- Kammerer, M. and Giangrande, A. (2001). *Glide2*, a second glial promoting factor in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **20**, 4664-4673.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-149.
- Lebestky, T., Jung, S. H. and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev.* **17**, 348-353.
- Lichanska, A. M. and Hume, D. A. (2000). Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp. Hematol.* **28**, 601-611.
- Lichanska, A. M., Browne, C. M., Henkel, G. W., Murphy, K. M., Ostrowski, M. C., McKercher, S. R., Maki, R. A. and Hume, D. A. (1999). Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood* **94**, 127-138.
- Meister, M. (2004). Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 10-15.
- Nelson, R. E., Fessler, L. L., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. and Fessler, J. H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.* **13**, 3438-3447.
- Otto, F., Lubbert, M. and Stock, M. (2003). Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J. Cell Biochem.* **89**, 9-18.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M. and Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-4031.
- Reuter, R. (1994). The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* **120**, 1123-1135.
- Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T. X., Look, A. T. and Kanki, J. P. (2005). Interplay of Pu.1 and Gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev. Cell* **8**, 97-108.
- Rizki, T. M., Rizki, R. M. and Grell, E. (1980). A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **188**, 91-99.
- Sears, H. C., Kennedy, C. J. and Garrity, P. A. (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* **130**, 3557-3565.
- Shepard, J. L. and Zon, L. I. (2000). Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. *Curr. Opin. Hematol.* **7**, 3-8.
- Spender, L. C., Whiteman, H. J., Karstegl, C. E. and Farrell, P. J. (2005). Transcriptional cross-regulation of RUNX1 by RUNX3 in human B cells. *Oncogene* **24**, 1873-1881.
- Tepass, U., Fessler, L. L., Aziz, A. and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-1837.
- Van De Bor, V. and Giangrande, A. (2002). *glide/gcm*: at the crossroads between neurons and glia. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 465-472.
- 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.
- Waltzer, L., Bataille, L., Peyrefitte, S. and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.* **21**, 5477-5486.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L. and Haenlin, M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.* **22**, 6516-6525.

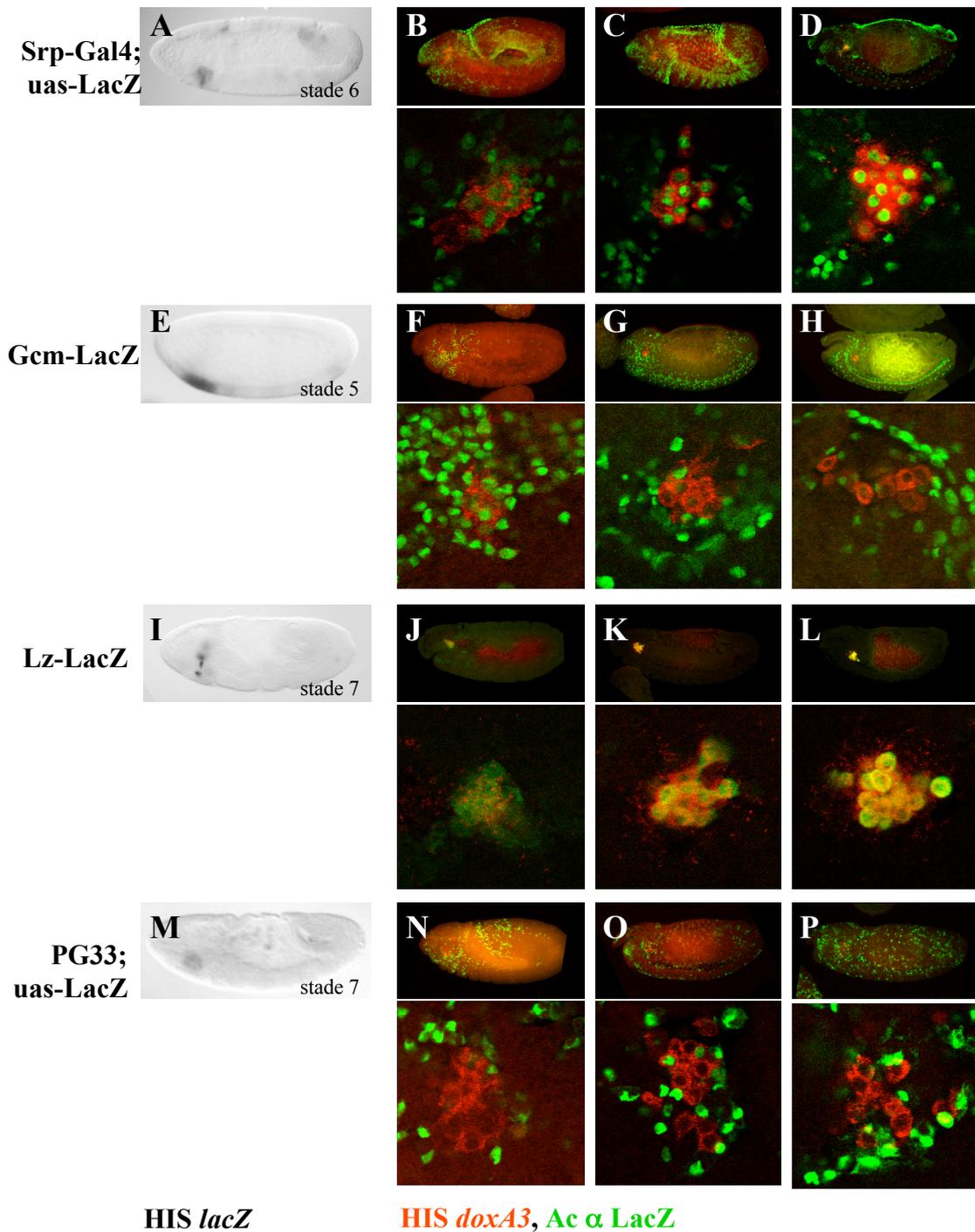


Figure 26 : Expériences de lignage dans les cellules à cristaux. Les différents génotypes et les marquages correspondants sont mentionnés sur la figure. (A,E,I,M) Stade d'initiation de l'expression des différents rapporteurs. (B-D, F-H, J-L, N-P) Traçage de la présence du LacZ dans les cellules à cristaux. Noter que l'initiation de l'expression de PG33; uas-LacZ et de Lz-LacZ débute au stade 7. On ne détecte jamais l'expression de PG33; uas-LacZ dans les cellules à cristaux.

IV. Discussion

Dans ce paragraphe, je vais présenter dans un premier temps des données complémentaires concernant la description de la ségrégation qui permettent d'avoir une vision détaillée de ce processus d'un point de vue spatio-temporel. Puis, dans un second temps, je discuterai de la régulation de cette étape et notamment des données concernant l'induction de ce processus essentiel de l'hématopoïèse.

A. Dynamique de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires

Les prohémyocytes (environ 80 cellules) sont spécifiés par *srp* au sein du mésoderme antérieur au stade blastoderme. Nous avons mis en évidence qu'à ce stade tous les prohémyocytes coexpriment *srp* et *gcm*, alors que *gcm* a été initialement décrit comme étant spécifique des plasmocytes. Très rapidement, au stade 6, l'expression de *gcm* est restreinte : la première rangée antérieure de prohémyocytes n'exprime plus *gcm*. Au contraire, son expression est maintenue dans la plus grande partie des prohémyocytes qui correspondent aux précurseurs des plasmocytes. Au stade 7, c'est-à-dire environ 5 à 10 minutes plus tard, l'initiation de l'expression de *lz* débute spécifiquement dans les prohémyocytes qui n'expriment plus *gcm* (8 à 10 cellules). A ce même stade, les précurseurs des plasmocytes commencent à exprimer spécifiquement le driver *PG33*. Ce driver correspond à une insertion d'élément P-Gal4 dans le promoteur du gène *silver* dont la fonction est actuellement inconnue. Des expériences de lignage montrent que *PG33* n'est jamais exprimés dans les cellules à cristaux et correspond donc à un marqueur spécifique des plasmocytes (Figure 26). L'ensemble de ces données montre que les précurseurs des plasmocytes et les progéniteurs *Lz*⁺ sont spécifiés dès le stade 7.

A ce stade, les hémocytes s'invaginent avec le sillon ventral puis commencent à migrer dans la tête. De manière simultanée, les hémocytes commencent à proliférer. Au cours de la phase de migration, on observe donc une augmentation du nombre de cellules *Lz*⁺. Ces progéniteurs *Lz*⁺ se rassemblent en deux groupes bilatéraux situés en position antérieure et dorsale par rapport aux précurseurs des plasmocytes (Figure 27). On ne sait pas précisément à quel moment les progéniteurs *Lz*⁺ s'engagent vers une différenciation en cellule à cristaux ou, dans 40% des cas, vers une différenciation en plasmocyte. Cependant, les observations

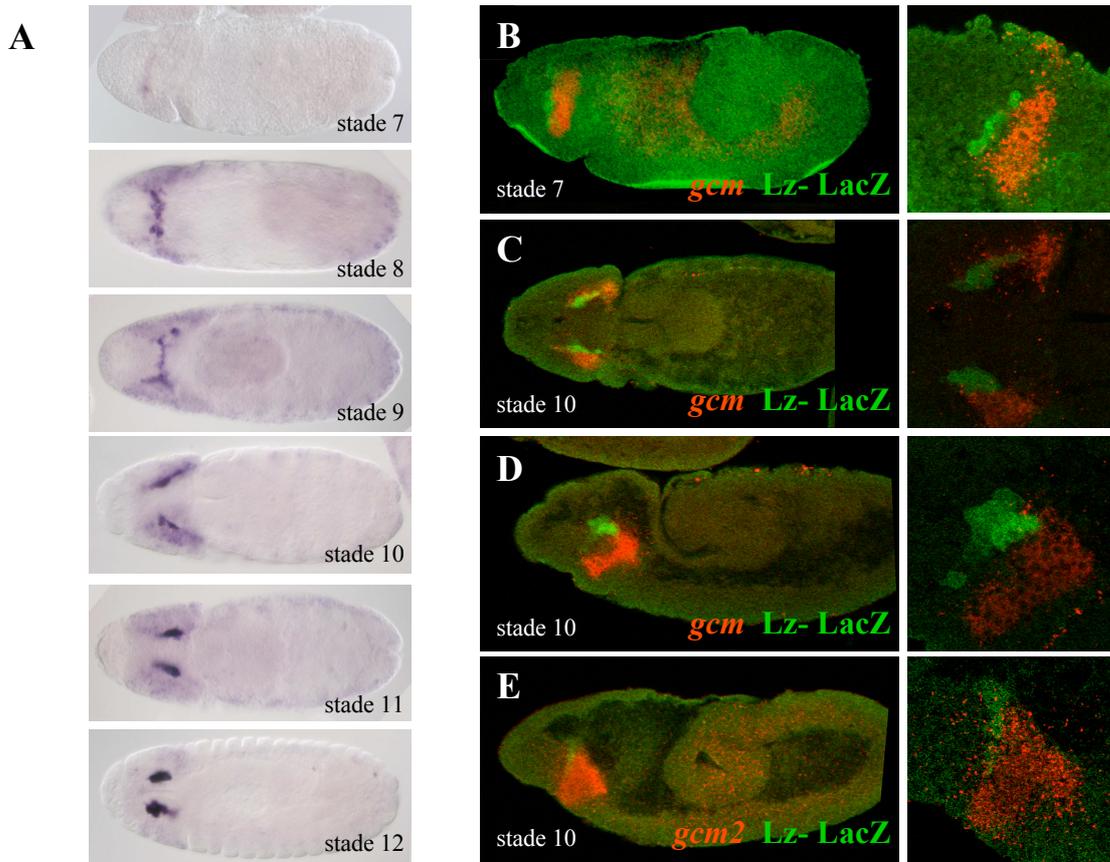
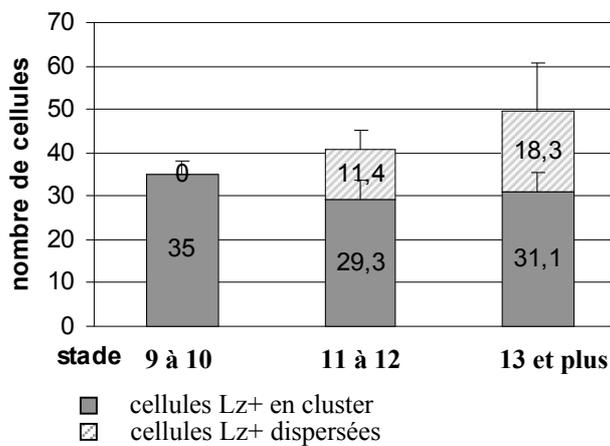


Figure 27 : Cinétique d'apparition des progéniteurs Lz⁺ et des plasmatocytes.
(A) Embryons Lz-LacZ en vue dorsale. Hybridation *in situ* contre *lacZ*. (B-E) Embryons Lz-LacZ, les différents marquages sont mentionnés sur la figure.



Graphe 1 : Prolifération des cellules Lz⁺. Comptages sur des embryons Lz-Gal4; *uas-Gal4* (x3); *uas-LacZ*. Précocement, il n'est pas possible de déterminer si les cellules Lz⁺ sont regroupées ou dispersées.

que j'ai réalisées montrent qu'aux stades 9 à 10 les clusters de cellules Lz⁺ sont étirés dans la région antérieure de l'embryon selon l'axe antéro-postérieur. Puis, au stade 11 les progéniteurs Lz⁺ se regroupent au niveau du proventricule (Figure 27). A ce stade, les cellules qui restent dans ces clusters se différencient en cellules à cristaux alors que les cellules Lz⁺ qui ne restent pas dans ces clusters se différencient en plasmatoctes et commencent à migrer dans l'embryon. Ces données suggèrent que le choix de destin des progéniteurs Lz⁺ entre une différenciation en plasmatoctes ou en cellule à cristaux se fait rapidement entre les stades 7 et 10.

Il est intéressant de noter que les cellules à cristaux semblent avoir un comportement mitotique différent des plasmatoctes. D'une part, plusieurs données montrent que les plasmatoctes prolifèrent activement au stade embryonnaire pour atteindre une population finale d'environ 700 plasmatoctes en fin d'embryogenèse. D'autre part, les comptages que j'ai réalisés afin de suivre le devenir des progéniteurs Lz⁺ montrent que le nombre de cellules Lz⁺ qui restent localisées au niveau des clusters n'augmente plus ou peu à partir du stade 12, alors que le nombre de cellules Lz⁺ retrouvées en circulation entre les stades 12 et la fin de l'embryogenèse augmente de manière importante (Graphe 1). Ces données suggèrent que, bien que les cellules à cristaux soient capables de proliférer (Lebestky et al., 2000), ces cellules prolifèrent moins que les cellules Lz⁺ qui adoptent un destin plasmatoctes.

Dans ce processus de ségrégation, ces données montrent donc qu'il existe une seconde étape de décision où les progéniteurs Lz⁺ adoptent un destin cellule à cristaux, ou dans 40% des cas un destin plasmatoctes. Lebestky et al. avaient déjà montré qu'une partie des cellules Lz⁺ se différencie en plasmatoctes et ne maintiennent pas l'expression de *lz* (Lebestky et al., 2000). Ils proposaient donc que ces cellules réinitient l'expression de *gcm* tardivement. Les résultats que nous avons obtenus montrent que ces progéniteurs Lz⁺ qui se différencient en plasmatoctes ne maintiennent pas l'expression de *lz* mais ne réexpriment ni *gcm* ni *gcm2* (Figure 27 D,E) Nous proposons que l'expression précoce de *gcm* et *gcm2* dans les prohématocytes soit responsable de la différenciation de ces cellules Lz⁺ en plasmatoctes.

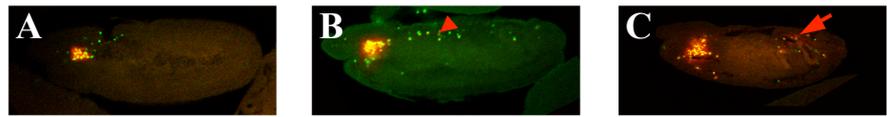
Nous ne savons pas en quelle mesure les plasmatoctes issus directement des prohématocytes et ceux qui sont issus des progéniteurs Lz⁺ sont identiques ou non. L'expression de *gcm* est détectée jusqu'au stade 10 dans les plasmatoctes, alors que les progéniteurs Lz⁺ cessent d'exprimer *gcm* beaucoup plus précocement, au stade 6, ce qui pourrait avoir une conséquence fonctionnelle importante sur la nature des plasmatoctes.

Néanmoins, Lebestky et al. ont montré que les progéniteurs *Lz*⁺ qui se différencient en plasmacytes expriment *Crq* (Lebestky et al., 2000), et sont capables de migrer dans l'embryon. Ces données ne permettent donc pas de mettre en évidence une différence entre ces deux catégories de plasmacytes. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de tester un plus grand nombre de marqueurs de différenciation des plasmacytes, tels que *Draper*, qui est décrit comme une cible de *gcm* (Freeman et al., 2003), *PG33* dont l'expression est perdue en contexte mutant pour *gcm/gcm2* ou encore *Hml* qui est décrit comme étant exprimé dans les cellules à cristaux et dans une sous population de plasmacytes dont on ne connaît actuellement pas la nature (Goto et al., 2003).

L'acquisition d'un destin plasmacyte ou cellule à cristaux au cours de l'hématopoïèse embryonnaire est contrôlée par un mécanisme faisant intervenir *gcm/gcm2* et *lz*. La régulation de l'expression de ces gènes est donc cruciale pour le contrôle de ce processus. Dans les parties suivantes, je souhaite donc compléter et discuter les données concernant la régulation de *gcm* et de *lz* et enfin présenter les travaux réalisés pour identifier le signal inducteur de cette ségrégation qui coordonne les expressions précoces de *gcm* et *lz*.

B. Régulation de la ségrégation par *gcm/gcm2* et *lz*

Plusieurs données montrent que l'activité des facteurs *Gcm* et *Lz* ne sont pas équivalentes. En effet, *Gcm* est suffisant pour diriger les hémocytes vers un destin plasmacytes et réprimer leur différenciation en cellules à cristaux (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997; Lebestky et al., 2000) (nos résultats), à l'inverse, *Lz* est requis pour la formation des cellules à cristaux mais ne réprime pas la formation des plasmacytes (Waltzer et al., 2003). Nous avons mis en évidence que la régulation de la ségrégation n'est pas contrôlée par un processus d'inhibition réciproque entre *lz* et *gcm/gcm2*, mais par un processus original où seul *Gcm/Gcm2* peut réprimer l'expression de *lz* et inhiber son autoactivation. Ce modèle est donc compatible avec les différences d'activités de *Gcm/Gcm2* et de *Lz* qui avaient été décrites.



D

	Wild type (n=26)		<i>gcm</i> ^{N7.4} (n=15)		<i>Df(2L)200</i> (n=14)	
	Clustered	Scattered	Clustered	Scattered	Clustered	Scattered
<i>lz</i> ⁺ cells (<i>lz-gal4;uas-lacZ</i> ⁺)	27 (±4.4)	17.2 (±5.6)	53.8 (±5.6)	42.5 (±7.8)	53.2 (±6.0)	43.4 (±10.3)
% Clustered	61%		56%	44%	55%	
% Scattered		39%		44%		45%
<i>doxA3</i> ⁺ cells	27 (±4.4)	1.7 (±1.3)	53.8 (±5.6)	9.6 (±3.4)	53.2 (±6.0)	39.9 (±11.8)
% of differentiation (<i>doxA3</i> ⁺)/(<i>lz</i> ⁺)	100%	10%	100%	23%	100%	92%

Figure 28 : *gcm* et *gcm2* sont des inhibiteurs de la différenciation en cellules à cristaux. (A-C) Visualisation des progéniteurs *Lz*⁺ (*Lz-LacZ*, en vert) et le leur différenciation en cellules à cristaux (*HIS doxA3*, en rouge) dans un embryon sauvage (A), dans un mutant *gcm*^{N7.4} (B) et dans un mutant *gcm/gcm2 Df(2L)200* (C). En condition perte de fonction pour *gcm* (B), toutes les cellules *Lz*⁺ ne se différencient pas en cellules à cristaux (tête de flèche). En contexte *Df(2L)200* (C), les progéniteurs *Lz*⁺ se différencient en cellules à cristaux (flèche). (D) Comptages des progéniteurs *Lz*⁺ (*Lz-LacZ*) et des cellules à cristaux (*doxA3*) sur des embryons wt ou mutants pour *gcm*, *gcm/gcm2*.

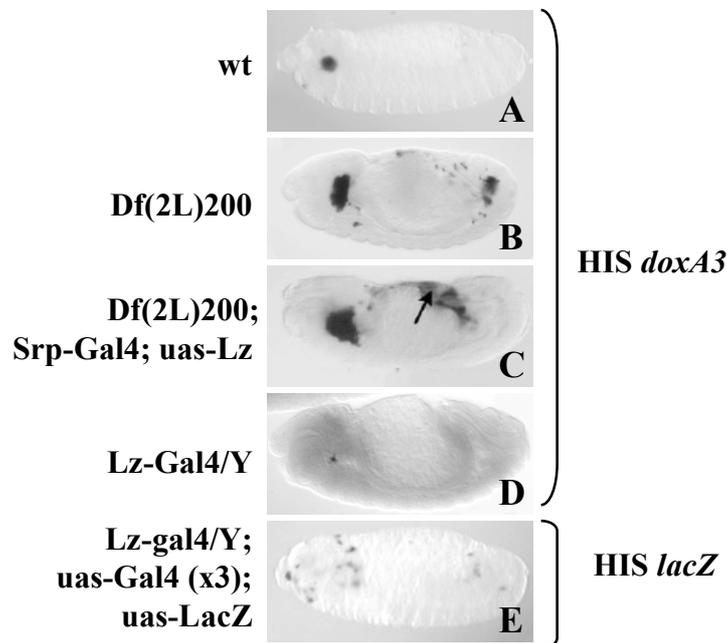


Figure 29 : Les prohémocytes sont des précurseurs bipotents. Les différents génotypes et les marquages sont mentionnés sur la figure. Noter que la surexpression de *lz* sous contrôle du driver *Srp-Gal4* induit une induction de *doxA3* dans l'amnioséreuse (flèche). Cette expression ectopique est indépendante du phénotype associé aux hémocytes. (D,E) Les progéniteurs *Lz*⁺ ne se différencient pas ou peu en cellules à cristaux et adoptent une morphologie de type plasmatocyte.

Ce résultat suggère que la dose relative de Lz et de Gcm/gcm2 dans les progéniteurs Lz+ vas contrôler leur différenciation en cellule à cristaux ou en plasmatoocyte. Plusieurs données expérimentales soutiennent cette hypothèse.

- (1) Nous avons mis en évidence que l'augmentation du nombre de cellules à cristaux en absence de *gcm/gcm2* est liée d'une part, à l'augmentation du nombre de progéniteurs Lz+ spécifiés au stade 7 et d'autre part, à la différenciation de tous ces précurseurs en cellules à cristaux. Cependant, même en absence de *gcm/gcm2*, 43 % des cellules à cristaux surnuméraires ne sont pas localisées au niveau des clusters bilatéraux mais sont dispersées dans l'embryon (Figure 28 C,D).
- (2) La perte de fonction de *gcm* induit une augmentation du nombre de cellules à cristaux mais drastique que la double perte de fonction *gcm/gcm2* et on détecte des cellules Lz+ dispersées dans l'embryon qui ne se différencient pas en cellules à cristaux. Dans ce contexte, il est envisageable que la présence de Gcm2 inhibe partiellement la différenciation des progéniteurs Lz+ en cellules à cristaux (Figure 28 B,D).
- (3) La surexpression de *lz* dans l'ensemble des hémocytes en absence de *gcm/gcm2* induit une différenciation massive de tous les prohémocytes en cellules à cristaux qui sont alors regroupées au niveau du proventricule (Figure 29 C).
- (4) En condition de perte de fonction partielle de *lz*, (contexte hypomorphe *lz-gal4/Y*), les cellules Lz+ ne se différencient que très rarement en cellules à cristaux et adoptent préférentiellement un destin plasmatoocyte (Figure 29 D,E).

Ces données montrent que : (i) la répression de la différenciation des précurseurs Lz+ en cellule à cristaux est dépendante de la dose de Gcm (comparaison des points (1) et (2)) ; (ii) l'acquisition d'un destin cellule à cristaux, défini par l'expression de marqueurs spécifiques et par la position de ces cellules au niveau des clusters, est dépendante de la dose de Lz (comparaison des points (1), (3) et (4)). Ces résultats suggèrent donc que la dose de Gcm/Gcm2 et de Lz influence la différenciation des progéniteurs Lz+ en cellule à cristaux.

De plus ces données mettent en évidence que les prohémocytes sont des précurseurs bipotents capables de générer uniquement des cellules à cristaux (3) ou uniquement des plasmatoocytes (4) en fonction de la dose respective des facteurs Gcm et Lz.

Ce mécanisme dose-dépendant permet de proposer une explication permettant d'expliquer comment se fait la résolution de destin des progéniteurs Lz+. Cependant, nous n'avons jamais mis en évidence de gradient d'expression de *gcm* ou de *lz* permettant d'expliquer pourquoi tous les progéniteurs Lz+ n'ont pas le même comportement.

Néanmoins, *gcm2* est lui aussi exprimé précocement dans les prohémyocytes (Alfonso and Jones, 2002). Bien que le très faible niveau d'expression de *gcm2* ne nous ait pas permis d'analyser précisément son expression précoce, il est envisageable que *gcm2* ait un rôle important dans le contrôle de la ségrégation.

Si le contrôle de la dose des facteurs Gcm/Gcm2 et Lz est important pour l'acquisition d'un destin, la régulation de l'expression de *gcm* et de *lz* est fondamentale. Dans les paragraphes suivants, je vais donc discuter de la régulation de l'expression de ces gènes.

C. Régulation de l'expression et de l'activité de Gcm

L'expression de *gcm* est finement régulée au cours des phases précoces de l'hématopoïèse : précocement, au stade 5, *gcm* est exprimé dans tous les prohémyocytes, puis très rapidement au stade 6, son expression est réprimée dans la rangée la plus antérieure de prohémyocytes alors que son expression est spécifiquement maintenue dans le reste de la population correspondant aux précurseurs des plasmacytes. Cependant les mécanismes qui régulent l'expression de ce gène au cours de ce processus ne sont pas identifiés.

1. Régulation de la transcription de *gcm* : éléments *cis*-régulateurs

L'analyse du promoteur de *gcm* a mis en évidence l'existence de modules de régulation qui contrôlent l'expression de ce gène spatialement et temporellement. Ainsi deux catégories de modules ont été mises en évidence : d'une part, les modules qui contrôlent l'expression de *gcm* au niveau des cellules hématopoïétiques, et d'autre part les modules qui contrôlent l'expression de *gcm* au niveau du système nerveux (Jones, 2005; Jones et al., 2004; Ragone et al., 2003). L'expression dans les hémocytes est contrôlée par deux éléments distincts responsables de l'expression de *gcm*, respectivement lors des phases précoces et lors des phases tardives du développement des hémocytes. La première région, située entre -0.2kb et le point d'initiation de la transcription, dirige l'expression de *gcm* au stade blastoderme de manière transitoire, au niveau du mésoderme procéphalique contenant le domaine d'apparition des prohémyocytes. La deuxième région, située entre -7.4 kb et -4.4 kb dirige

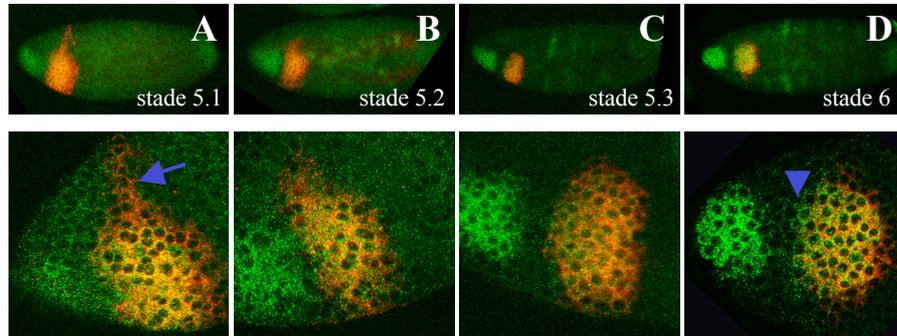


Figure 30 : (A-D) Expression précoce de *gcm* au niveau du territoire hématopoïétique. Marquage par double hybridation *in situ* en fluorescence de *gcm* (rouge) et *srp* (vert) sur des embryons wt de stades 5 (A-C) à 6 (D). Au début du stade 5, l'expression de *gcm* n'est pas restreinte au domaine *srp* (flèche). Au stade 6, l'expression de *gcm* disparaît dans la rangée antérieure de prohématocytes *srp*⁺ (tête de flèche).

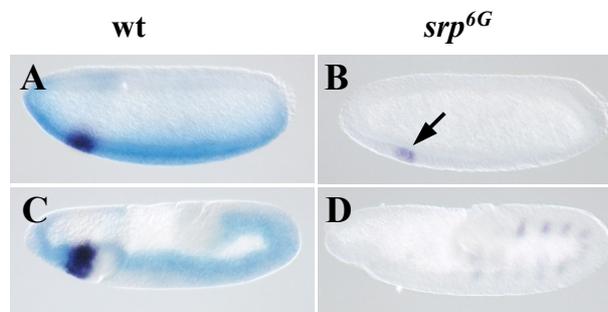


Figure 31 : Régulation de l'expression de *gcm* par *srp*. Embryons *srp*^{6G}/TM3twist-*lacZ* (A,C) ou *srp*^{6G}/*srp*^{6G} (B,D). Hybridation *in situ* contre *gcm* (bleu foncé) et contre *lacZ* (bleu clair). Embryons de stade 5 à 6 (A,B) et de stade 7 à 8 (C,D). En absence de *srp*, *gcm* s'exprime précocement de façon transitoire (flèche).

l'expression de *gcm* dans les hémocytes à partir du stade 6 et l'expression est maintenue dans cette population au cours du développement embryonnaire (Jones et al., 2004). Il semble donc que la régulation de l'expression de *gcm* dans les hémocytes se fasse en deux étapes successives : précocement au stade blastoderme (stade 5) puis plus tardivement à partir du stade 6.

L'étude du processus de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires nous a conduit à analyser finement l'expression de *gcm* aux stades précoces de l'embryogenèse. Nos résultats mettent en évidence l'existence d'un relais dans les mécanismes de régulation de l'expression de *gcm* au cours de l'hématopoïèse. En effet, de manière très surprenante, nous avons montré qu'à un stade blastoderme précoce (au début de la cellularisation), l'expression de *gcm* dans la tête est beaucoup plus large que le domaine de formation des prohémocytes, caractérisé par l'expression de *srp* (Figure 30). Cette expression qui remonte dorsalement pour former un anneau est transitoire et en fin de stade 5, l'expression de *gcm* est restreinte au domaine de formation des prohémocytes. De plus nous avons montré que cette expression précoce de *gcm* est indépendante de la régulation par *Srp*. En effet, dans un mutant *srp*, on détecte de manière transitoire une expression de *gcm* au stade 5 (Figure 31). Le profil d'expression précoce de *gcm* suggère une régulation dépendante du patterning dorso-ventral et antéro-postérieur du blastoderme.

Au stade 6, l'expression de *gcm* est restreinte aux précurseurs des plasmacytes et est maintenue spécifiquement dans cette population. Il est surprenant de constater que le deuxième module (-7.4 kb à -4.4 kb) contrôle l'expression de *gcm* à partir de ce même stade. De plus, à partir de ce stade, l'expression de *gcm* est dépendante de *Srp*. Or dans le fragment de promoteur situé entre -7.4 kb et -4.4 kb, nous avons identifié par une analyse bio-informatique plusieurs sites de fixation à un facteur de type GATA (Figure 19).

Ces données suggèrent qu'il existe un relais entre les mécanismes qui contrôlent l'expression de *gcm* précocement (avant le stade 6) et tardivement (après le stade 6), c'est-à-dire après l'étape de ségrégation et l'engagement des cellules vers le destin plasmacyte.

2. Maintien de l'expression de *gcm* : autorégulation

Le fragment de promoteur de *gcm* situé entre -7.4 kb et -4.4 kb contient deux sites de fixation pour *Gcm* de haute affinité (GBS) et trois sites de faible affinité (GBSs), ce qui

suggère l'existence d'un maintien de l'expression de *gcm* par auto-régulation (De Iaco et al., 2006). Jones et al. ont montré que l'expression d'un gène rapporteur sous dépendance de ce fragment de promoteur persiste en contexte mutant pour *gcm*. Les auteurs proposent donc que l'auto-régulation de *gcm* ne soit pas impliquée dans le maintien de son expression (Jones et al., 2004). Cependant, au cours de l'hématopoïèse, *gcm2* est aussi exprimé dans les hémocytes. La présence de Gcm2 pourrait alors expliquer le maintien de l'expression de *gcm* par auto-régulation, lié à la redondance fonctionnelle entre Gcm et Gcm2.

D'autres données suggèrent que l'auto-régulation n'existe pas dans les tissus mésodermiques. En effet, l'expression pan-mésodermique de Gcm (*twi-gal4 ; uas-gcm*) n'induit pas ou seulement dans peu de cellules l'expression de *gcm-lacZ*, alors que *gcm-lacZ* répond fortement à une surexpression de Gcm dans les territoires neurogéniques (Miller et al., 1998). Il est donc proposé que l'auto-régulation de *gcm* soit tissu-spécifique, et dépende de la présence de cofacteurs positifs ou négatifs. L'auto-régulation de *gcm* reste cependant à tester dans le territoire spécifique de formation des hémocytes.

3. Régulation de l'activité de Gcm par des co-facteurs

La régulation spatiale de l'expression de *gcm* précocement, c'est-à-dire la répression localisée de son expression et son maintien dans la majorité des pro-hémocytes, suggère l'influence d'un facteur impliqué dans le patterning du territoire hématopoïétique. Il est donc envisageable qu'il existe un co-facteur de Gcm, impliqué dans la modulation de son activité et/ou dans la régulation de son expression et qui permettrait de passer d'une expression dans tous les pro-hémocytes à une expression restreinte. Une problématique similaire se pose lors de la gliogénèse. En effet, Gcm est requis pour induire la différenciation des cellules gliales, cependant, il existe différents types de cellules gliales. La recherche de gènes cibles de Gcm a permis de mettre en évidence trois types de gènes cibles lors de la gliogénèse : des gènes exprimés dans la totalité des cellules gliales du SNC, des gènes exprimés de manière spatialement restreinte dans des sous-populations de cellules gliales et des gènes exprimés de manière temporellement restreinte. Ces données suggèrent l'existence de cofacteurs de Gcm spatialement ou temporellement restreints, qui contribueraient à la génération de la diversité des sous-types gliaux (Freeman et al., 2003; Jones, 2005). De plus, Gcm a la capacité de promouvoir la différenciation des cellules gliales et des plasmocytes, donc d'intervenir dans différents contextes développementaux. Certains gènes cibles de Gcm sont activés

spécifiquement dans les cellules gliales et non dans les hémocytes et réciproquement, ce qui suggère que des facteurs additionnels agissent en combinaison avec Gcm pour promouvoir la différenciation spécifique de chaque type cellulaire (Jones, 2005).

Récemment, plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de co-facteurs des facteurs de transcription de type GCM. Chez la Drosophile, lors de la gliogenèse, Gcm et Hucklebein (Hkb) sont coexprimés dans une sous population de cellules gliales. De Iaco et al. ont montré que la protéine Gcm et la protéine à homéodomaine Hkb interagissent physiquement et que ce complexe augmente l'auto-régulation de *gcm*. Ce mécanisme de contrôle permet une régulation différentielle de la dose de Gcm, ce qui est déterminant pour la spécification des différents sous-types gliaux (De Iaco et al., 2006). De manière analogue, il a été montré que la protéine GCMA de vertébré interagit avec le facteur de transcription à homéodomaine Pitx *via* le domaine de liaison à l'ADN de Gcm et l'homéodomaine de Pitx. Il est intéressant de noter que le domaine de liaison à l'ADN des protéines de la famille GCM est très fortement conservé au cours de l'évolution. L'interaction GCMA/Pitx favorise la fixation de chaque facteur de transcription sur leur site de fixation à l'ADN respectif. De plus, la présence de Pitx modifie la capacité transactivatrice de Gcm de manière dépendante du contexte cellulaire (Schubert et al., 2004). Ces deux études mettent en évidence l'existence d'une régulation de l'activité des facteurs de transcription de type GCM par des protéines à homéodomaine.

De manière intéressante, Gcm est nécessaire et suffisant pour induire l'expression de la protéine à homéodomaine Distalless (Dll) dans les hémocytes (Freeman et al., 2003). Bien qu'il n'y ait actuellement aucune évidence de la modulation de l'activité et/ou de l'expression de *gcm* par des cofacteurs au cours de l'hématopoïèse embryonnaire, il est envisageable qu'un tel processus de régulation soit impliqué dans la régulation de l'étape précoce de la ségrégation.

D. Régulation de l'expression de *lz*

Au cours de l'hématopoïèse embryonnaire, nous avons montré que *lz* est exprimé à partir du stade 7 dans une sous population d'hémocytes. Puis son expression est maintenue par autorégulation ce qui permet la différenciation de 60% des progéniteurs Lz⁺ en cellules à cristaux. Les cellules Lz⁺ qui ne maintiennent pas l'expression de *lz* se différencient en

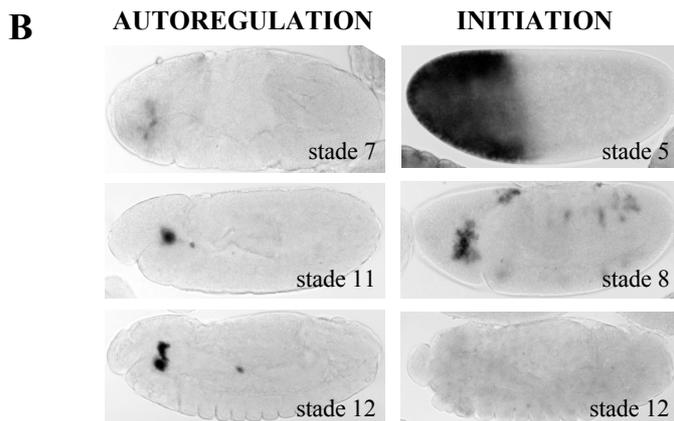
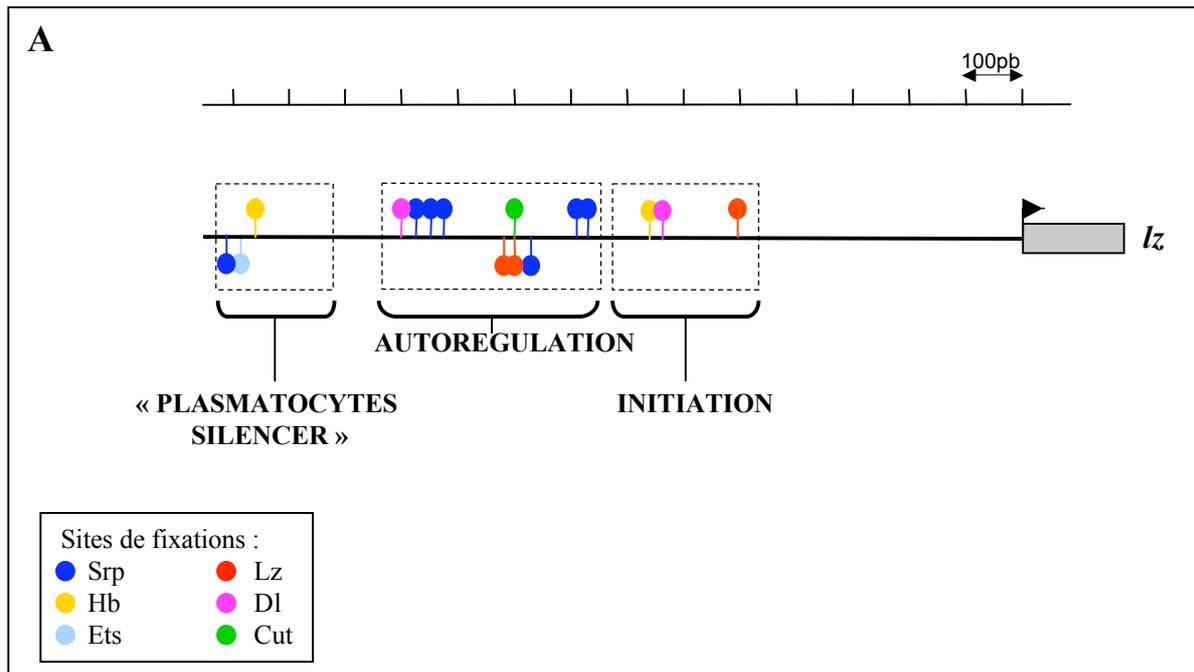


Figure 32 : Promoteur de *lz*. (A) Représentation schématique du promoteur de *lz*. Cartographie réalisée avec Mat Inspector // www.genomatix.de. (B) Expression de rapporteur *lacZ* sous contrôle des différents modules de régulation.

plasmatoctes. L'expression de *srp* est strictement requise pour induire l'expression de *lz* au stade embryonnaire (Lebestky et al., 2000; Waltzer et al., 2003). De plus nous avons montré que *Gcm* et *Gcm2* sont des inhibiteurs de l'expression de *lz*. Ici, nous avons mis en évidence que l'expression de *lz* est spatialement restreinte à la région antérieure du domaine hématopoïétique même en absence de *gcm*. Afin de comprendre comment l'expression de *lz* est régulée précocement, nous avons donc recherché les éléments *cis*-régulateurs de *lz* par analyse de son promoteur.

1. Régulation de la transcription de *lz* : éléments *cis*-régulateurs

Yan et al. ont recherché et identifié dans l'intron 2 la séquence enhancer de *lz* qui dirige son expression dans l'œil (Yan et al., 2003). De manière similaire, nous avons mis en évidence au laboratoire que la région promotrice de 1,5 kb située en amont de *lz* est suffisante pour reproduire le patron d'expression de *lz* au cours de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire. Afin de caractériser plus précisément les éléments *cis*-régulateurs responsables de son expression au cours de ce processus, l'analyse du fragment de 1,5 kb a été poursuivie au laboratoire (Benoît AUGÉ, résultats non-publiés). Plusieurs modules de régulation ont été caractérisés au sein de cette région promotrice : (i) un module d'autorégulation, (ii) un module d'initiation, (iii) un module de répression « plasmatoctes silencer » (Figure 32). Les résultats préliminaires montrent que :

- Le module d'autorégulation dirige l'expression du gène rapporteur à partir du stade 7 ~ 8 dans une population qui semble correspondre aux cellules *Lz+*. Puis l'expression de ce transgène est maintenue dans la population des cellules à cristaux jusqu'à la fin de l'embryogenèse. Ce module comporte plusieurs sites GATA et Runx, ce qui suggère que, comme *lz* endogène, ce module est soumis à la régulation par le complexe *Srp/Lz*. Actuellement, l'analyse de cet enhancer est en cours afin de déterminer l'importance fonctionnelle de ces sites dans le contrôle de l'expression de *lz*.
- Le module d'initiation dirige l'expression du gène rapporteur très précocement à partir du stade blastoderme. A ce stade, de manière surprenante, l'expression du gène rapporteur est détectée dans la totalité de la région antérieure de l'embryon. Ce patron d'expression semble similaire au territoire d'expression de *hunchback* (*hb*). Puis, rapidement l'expression du rapporteur est restreinte au territoire hématopoïétique. Il est à noter qu'à ce stade, il semble que ce transgène soit exprimé dans l'ensemble des

hémocytes, et pas seulement dans la sous population Lz+. Enfin, l'expression dans les hémocytes disparaît rapidement. De manière intéressante le domaine d'initiation contient des sites de fixation Hb et des sites de fixation à Dorsal.

- Enfin la présence du module appelé « plasmatoocyte silencer » semble nécessaire pour restreindre l'expression d'un gène rapporteur à la population des progéniteurs Lz+. En effet, la comparaison entre différentes constructions enhancer, montre qu'en absence de ce domaine, l'expression des transgène possédant le module d'initiation semble étendue à l'ensemble des hémocytes. À l'inverse la présence de ce module restreint l'expression des transgènes à une sous-population qui semble correspondre aux cellules Lz+. Ce module contient notamment des sites Ets et Cut.

Le découpage du promoteur de *lz* a permis d'identifier des modules de régulation de son expression. Cependant des analyses plus fines de l'expression de ces constructions, notamment par colocalisation avec Lz et Srp, sont nécessaires pour déterminer précisément le patron d'expression de ces transgènes. D'autre part, les facteurs directement impliqués dans le contrôle de l'expression de *lz* restent à identifier.

2. Régulation de la transcription de *lz* : facteurs en *trans*

L'analyse du promoteur de *lz* a permis d'identifier plusieurs sites de fixation à des facteurs de transcription. Je souhaite revenir brièvement sur les données concernant certains de ces facteurs potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de *lz*.

✓ Facteur de type Ets

Dans le chapitre précédent, j'ai déjà évoqué le rôle éventuel des facteurs de type Ets dans la modulation de l'activité des facteurs GATA et RUNX (Rekhtman et al., 2003) (Jackson Behan et al., 2005). De plus, chez la Drosophile, Zettervall et al. ont montré que la surexpression du facteur Ets Pointed (Pnt) dans les hémocytes larvaires induit une surprolifération des hémocytes et la formation de tumeurs mélaniques (Zettervall et al., 2004), ce qui suggère que *pnt* pourrait être impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse. L'étude de la fonction de Pnt et des autres facteurs Ets semble donc une piste intéressante pour comprendre comment l'expression de *lz* est régulée lors de l'hématopoïèse embryonnaire.

✓ *Facteur de transcription Cut*

De même, j'ai déjà discuté de la fonction potentielle du facteur Cut dans la régulation de l'activité de Lz. Il est intéressant de constater que dans le promoteur de *lz* on trouve des sites Cut situés à proximité de sites Runt. Canon et al. ont mis en évidence dans l'œil l'existence d'une régulation de l'activité transcriptionnelle de Lz par la protéine à homéodomaine Cut : l'interaction Cut/Lz permet de stabiliser le complexe Lz/Gro et transforme le facteur activateur RUNX en facteur répresseur (Canon and Banerjee, 2003).

L'identification de séquences de fixation de ces facteurs dans le promoteur de *lz* permet d'envisager une approche gène candidat afin de comprendre comment *lz* est régulé précocement.

3. Influence de Ush sur *lz*

Il a été montré que Ush est un inhibiteur de la différenciation des cellules à cristaux. Dans une perte de fonction de *ush*, le nombre de cellules à cristaux augmente, alors qu'une surexpression de *ush* dans les progéniteurs Lz⁺ inhibe leur différenciation en cellules à cristaux (Fossett et al., 2001). En contexte mutant pour *ush* l'augmentation du nombre de cellules à cristaux est moins importante que dans un contexte de perte de fonction pour *gcm*.

ush est exprimé dans le territoire hématopoïétique à partir du stade 8. Au stade 10, certains des progéniteurs Lz⁺ coexpriment Ush, puis son expression diminue dans cette population et en fin d'embryogenèse, les cellules Lz⁺ regroupées en clusters ne colocalisent plus avec Ush (Fossett et al., 2001; Fossett et al., 2000). Il semble que les progéniteurs Lz⁺ qui coexpriment précocement Ush correspondent à des cellules dispersées et pourraient donc correspondre aux cellules Lz⁺ qui se différencient en plasmacytes. Il est possible, aux vues de l'expression tardive de *ush* dans les hémocytes, que Ush intervienne lors de l'étape de différenciation des progéniteurs Lz⁺ en inhibant leur différenciation en cellules à cristaux.

Pourquoi tous les progéniteurs Lz⁺ n'expriment pas *ush* ? Dans le chapitre précédent, j'ai déjà évoqué les résultats de Fossett et al. qui suggèrent que le complexe SrpNC/Lz a une activité répressive sur l'expression de *ush* (Fossett et al., 2003). Il est donc envisageable que la dose de Lz dans les progéniteurs Lz⁺ soit importante pour réprimer *ush*. L'ensemble de ces

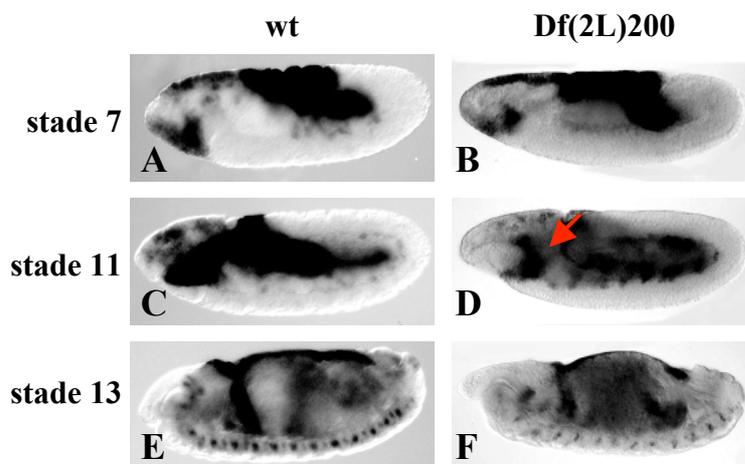


Figure 33 : Régulation de l'expression de *ush* par *gcm/gcm2*. Visualisation de l'expression de *ush* par hybridation *in situ* contre *ush* dans des embryons wt (A,C,E) ou mutants pour *gcm/gcm2* Df(2L)200 (B,D,F) à différents stades. L'expression de *ush* dans les hémocytes n'est pas affectée en absence de *gcm/gcm2* (flèche).

données suggère que la différenciation des progéniteurs *Lz*⁺ en cellules à cristaux ou en plasmatoctes dépend d'une balance fine entre les différents facteurs *Lz*, *Gcm/Gcm2*, *Srp* et *Ush* : (i) *Gcm* et *SrpNC/Ush* répriment la différenciation de ces progéniteurs en cellule à cristaux, (ii) le complexe *Srp/Lz* permet de maintenir l'expression de *lz* par autorégulation et induit le programme de différenciation spécifique des cellules à cristaux, (iii) le complexe *Srp/Lz* réprime l'expression de *ush*.

Quelles sont les relations entre *gcm* et *ush* dans la répression de la formation des cellules à cristaux ? L'une des hypothèses est que *ush* soit une cible de *Gcm*, et que ce facteur soit « l'effecteur » de la répression de la différenciation des progéniteurs *Lz*⁺ en cellules à cristaux. Cependant, en condition de perte de fonction *gcm/gcm2*, il ne semble pas que l'expression de *ush* soit modifiée de manière drastique (Figure 33). Bien que la relation entre *ush* et *gcm* au cours de cette étape ne soit que partiellement analysée, ces résultats préliminaires suggèrent que *Gcm* et *Ush* inhibent la différenciation des cellules à cristaux par deux voies distinctes.

E. Recherche du signal inducteur de la ségrégation

Une des questions cruciales de l'étape de ségrégation des plasmatoctes et des cellules à cristaux est de comprendre comment l'induction de ce processus est contrôlée, c'est-à-dire comprendre comment sont coordonnés précocement la répression de *gcm* et l'induction de *lz* dans la rangée antérieure de prohémoctes.

1. Rôle de la prolifération

Dans un premier temps, nous avons testé l'influence de la prolifération sur l'acquisition du destin plasmatoctes *versus* cellule à cristaux. En effet, dans de nombreux systèmes développementaux, l'engagement des cellules vers un destin spécifique est lié à une étape de division asymétrique du précurseur commun qui génère deux cellules filles dont les caractéristiques diffèrent (Roegiers and Jan, 2004).

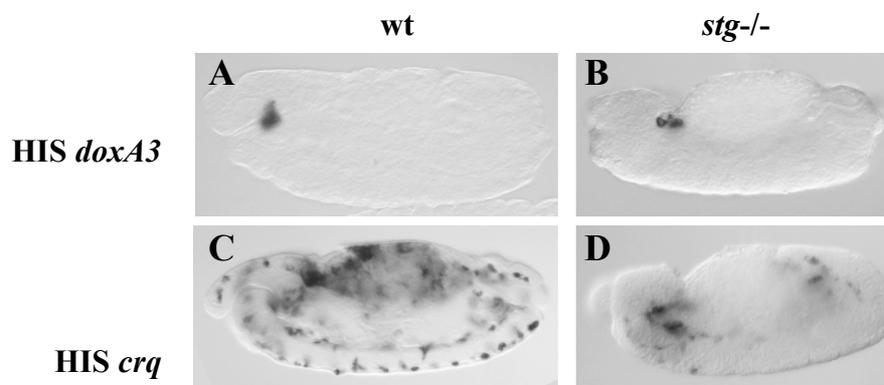


Figure 34 : Influence de la prolifération. Embryons de stade 13, wt (A,C) ou *stg*^{-/-} (B,D). Même en absence de prolifération, des cellules à cristaux (*dox43*) et les plasmacytes (*crq*) sont formés. Il est à noter qu'en contexte mutant *stg*, le nombre de cellules hématopoïétiques est plus faible.

Au stade embryonnaire, la prolifération embryonnaire est bloquée au stade blastoderme en interphase du cycle 14 et la prolifération ne reprend dans les différents domaines mitotiques qu'au stade 7 (Edgar and O'Farrell, 1989; Foe, 1989). Dans le domaine hématopoïétique, la première manifestation de la ségrégation qui se traduit par le maintien de l'expression de *gcm* dans la majeure partie des prohémyocytes et la répression de son expression dans la rangée antérieure a lieu au stade 6. Cette donnée suggère que la ségrégation est indépendante de la prolifération des hémyocytes. En accord avec cette information, dans un contexte mutant *string*^{-/-}, homologue de CDC25, dans lequel il n'y a pas de reprise de la prolifération au stade 7 (Edgar and O'Farrell, 1989), les deux populations plasmotocytes et cellules à cristaux sont formées (Figure 34), ce qui démontre que la ségrégation est indépendante de la prolifération.

2. Rôle de la signalisation Notch

La voie de signalisation Notch joue un rôle critique dans la régulation de nombreux contextes développementaux (Portin, 2002). De nombreux travaux ont été menés, notamment chez la Drosophile, sur le rôle de Notch dans la régulation de l'engagement des cellules vers un destin spécifique. Au moins trois modes d'action de Notch ont été mis en évidence (Dumortier et al., 2005) : 1) Notch contrôle la sélection d'un progéniteur au sein d'un groupe de compétence par inhibition latérale, 2) Notch contrôle le choix binaire entre deux destins possibles à partir d'un précurseur commun par division asymétrique, 3) Notch peut directement induire la différenciation terminale d'une population cellulaire. Bien que nous ayons mis en évidence que la ségrégation est indépendante de la prolifération et donc de la division asymétrique, il est envisageable que Notch contrôle l'acquisition du destin cellule à cristaux par un autre mécanisme.

Au stade larvaire, Lebestky et al. ont montré que la voie de signalisation Notch contrôle l'induction de l'expression de *Iz* dans la glande lymphatique (Lebestky et al., 2003). Il semble donc que dans ce contexte, la voie de signalisation Notch induise la différenciation des cellules à cristaux. De plus, les auteurs ont montré qu'au stade embryonnaire, la perte de fonction zygotique de Notch (*N*^{55e11}) induit une réduction du nombre de cellules à cristaux formées. Les auteurs proposent que la présence de cellules à cristaux résiduelles soit liée la contribution maternelle de Notch (Lebestky et al., 2003). Nous avons donc poursuivi l'étude

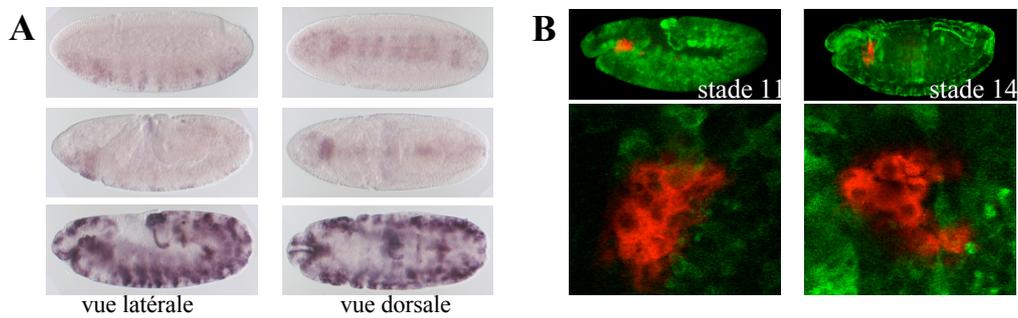


Figure 35 : Visualisation de l'induction de la voie Notch au stade embryonnaire. (A,B) Embryons Su(H)-LacZ. (A) hybridation *in situ* contre *lacZ*, (B) Marquage des cellules à cristaux par hybridation *in situ* contre *dox43* et immunolocalisation de LacZ.

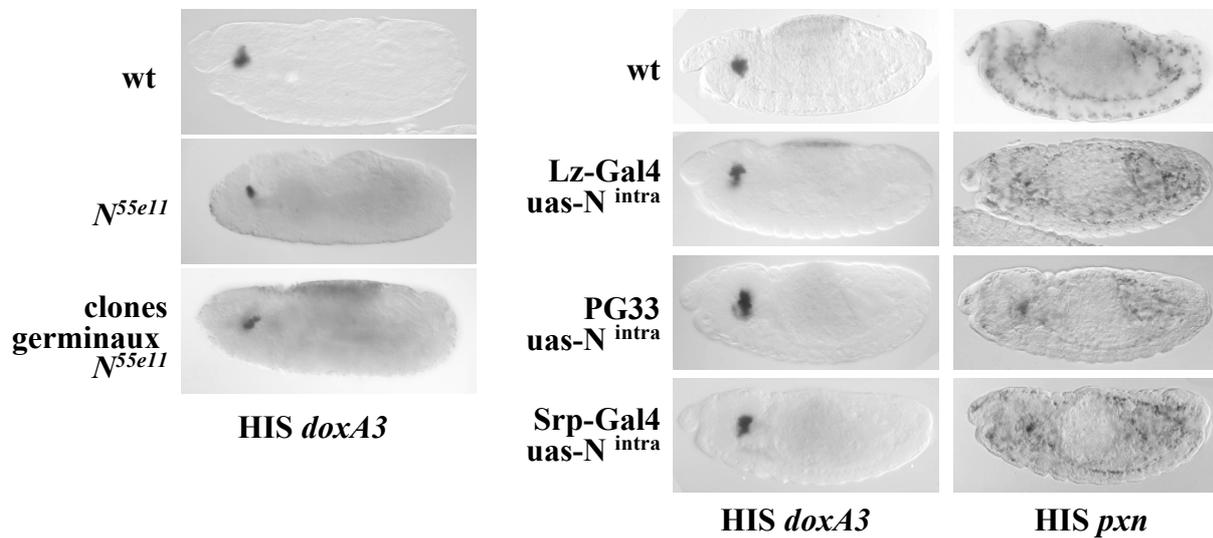


Figure 36 : Influence de Notch sur la formation des hémocytes. Les différents génotypes et les marquages réalisés sont reportés sur la figure.

du rôle de la voie Notch sur la formation des cellules à cristaux et des plasmacytes au cours de l'hématopoïèse embryonnaire.

Dans un premier temps, afin de déterminer si la voie de signalisation Notch est induite dans le territoire hématopoïétique, nous avons analysé le patron d'expression du rapporteur *Su(H)-lacZ* (Figure 35). Ce rapporteur contient des sites de fixation à Su(H), l'effecteur de la voie Notch, et reproduit l'activation de cette voie. Précocement, au stade blastoderme, l'expression de ce rapporteur n'est pas détectée dans le territoire hématopoïétique, mais rapidement, à partir du stade 6, la voie Notch est induite dans l'ensemble du mésoderme, notamment au niveau des précurseurs hématopoïétiques. Cependant, malgré la stabilité de la protéine LacZ, on ne détecte pas la présence de LacZ dans les cellules à cristaux différenciées. Ceci suggère que la voie Notch n'est pas induite dans les précurseurs de ce lignage. Aux vues du patron d'expression extrêmement complexe de *Su(H)-lacZ* au cours de l'embryogenèse, le niveau de résolution de nos expériences ne permet pas de déterminer si la voie Notch est induite dans les plasmacytes. Afin de compléter l'analyse du rôle de la voie Notch au cours de l'hématopoïèse embryonnaire, nous avons utilisé une approche génétique classique par perte et gain de fonction de Notch (Figure 36). Nous avons généré des clones germinaux *N^{55e11}* qui permettent de supprimer à la fois la contribution maternelle et zygotique de Notch. Dans ce contexte, on observe la formation de cellules à cristaux en nombre réduit. Cette diminution du nombre de cellules à cristaux formées peut cependant être une conséquence secondaire de la perte de fonction de Notch qui affecte drastiquement le développement embryonnaire. D'autre part, la surexpression d'une forme de Notch constitutivement active, dans l'ensemble des hémocytes, spécifiquement dans les cellules à cristaux ou spécifiquement dans les plasmacytes, n'induit pas la formation de cellules à cristaux surnuméraires contrairement à ce qui a été observé dans la larve. L'ensemble de ces données montre que la voie de signalisation Notch n'est ni requise ni suffisante pour induire la formation des cellules à cristaux au cours de l'hématopoïèse embryonnaire. De plus, la formation des plasmacytes n'est pas affectée dans les différents contextes de surexpression analysés. Ces résultats montrent donc que l'étape de ségrégation qui mène à l'acquisition d'un destin plasmacyte ou cellule à cristaux n'est pas régulée par Notch au stade embryonnaire.

3. Influence du patterning de la tête

La répression localisée de *gcm* au stade 6 et l'induction de *lz* dans la première rangée de prohémyocytes, suggère un effet du patterning de la tête dans la subdivision antéropostérieure du territoire hématopoïétique. Nous avons donc envisagé d'étudier l'influence des gènes responsables de la segmentation antéropostérieure de la tête sur la formation des hémyocytes embryonnaires. Notre hypothèse était que la perte de fonction de l'un des gènes impliqué dans la subdivision du domaine hématopoïétique, conduirait à un défaut de formation spécifique des cellules à cristaux (absence de formation ou, au contraire, différenciation de tout les prohémyocytes en cellules à cristaux).

La segmentation de la tête, qui correspond au domaine situé en antérieur au sillon céphalique, fait intervenir des mécanismes différents de ceux impliqués dans la segmentation du tronc. En effet, la segmentation du tronc est contrôlée par les gènes *gap*, comme *hunchback* (*hb*) *Krüppel* ou *knirps* qui se régulent entre eux et déterminent des territoires adjacents spécifiques (pour revue (Jackle et al., 1992)). Au contraire, les quatre gènes *gap* (*gap-like*) de la tête, *orthodenticle* (*otd*), *empty spiracle* (*ems*), *buttonhead* (*btd*) et *sloppy paired* (*slp1* et *slp2*) ont des patrons d'expression partiellement recouvrants au stade blastoderme et aucune régulation croisée n'a été observée entre ces gènes (Cohen and Jurgens, 1990; Dalton et al., 1989; Finkelstein and Perrimon, 1990; Grossniklaus et al., 1994; Grossniklaus et al., 1992; Wimmer et al., 1995). Les patrons d'expression des gènes *gap* définissent sept sous-domaines : [*otd*], [*otd slp*], [*otd slp ems*], [*otd slp ems btd*], [*slp ems btd*], [*slp btd*] et [*btd*] (Grossniklaus et al., 1994) et chaque gène est exprimé dans plusieurs anlage de segments qui ne se développent pas en contexte mutant (Dalton et al., 1989; Grossniklaus et al., 1994). Il est proposé que ces gènes spécifient l'identité des segments de la tête sans passer par un second niveau de régulation équivalent aux gènes *pair rule* dans le tronc.

En 1997, Yin et al. ont montré que la perte de fonction de *btd* induit une diminution drastique de la taille du domaine de formation des prohémyocytes visualisés par l'expression de *srp*. Les auteurs ont montré que dans un contexte sauvage, le domaine d'expression mésodermique de *srp* est exclusif du territoire d'expression de *tinman* (*tin*). La perte de fonction de *btd* entraîne une expansion de l'expression de *tin* et l'expression de *srp* est restreinte et transitoire. Les auteurs proposent donc que Btd soit nécessaire pour réprimer *tin* et induire *srp* dans cette région (Yin et al., 1997). Cependant, même en absence de *btd*, on observe une expression résiduelle de *srp* et tardivement des plasmatocytes sont formés. Ceci

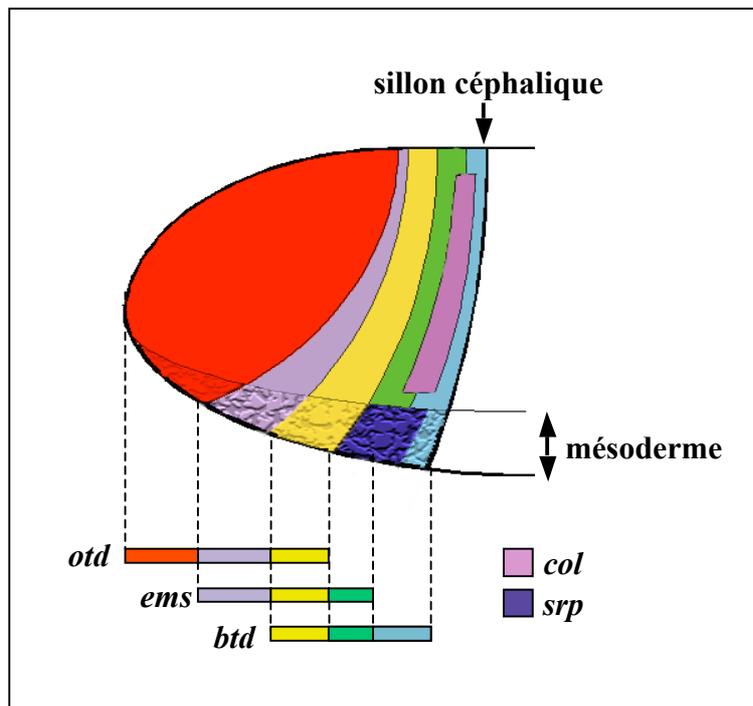


Figure 37 : Position du domaine de formation des prohémocytes par rapport à la segmentation de la tête. Représentation schématique de la région procéphalique au stade blastoderme. Le territoire *srp*⁺ semble chevaucher deux territoires, [*ems btd*] et [*btd*]. Le domaine d'expression de *slp1/slp2* n'est pas représenté mais colocalise avec le domaine *srp*⁺ dans la région la plus postérieure.

suggère donc que *btd* n'est pas le seul gène gap responsable de l'induction de *srp* dans le mésoderme procéphalique. De plus on ne sait pas si la formation des cellules à cristaux est affectée dans un mutant *btd*.

J'ai donc entrepris de tester l'influence des quatre gènes gap, *otd*, *ems*, *btd* et *slp1/slp2* sur l'expression précoce de *srp* et sur la formation des deux lignages, plasmatocytes et cellules à cristaux. De plus, j'ai testé le rôle éventuel de *col* lors de l'hématopoïèse embryonnaire. En effet, *col*, qui participe à la régulation de l'hématopoïèse larvaire (Crozatier et al., 2004), est exprimé au stade blastoderme dans un territoire qui semble correspondre au domaine hématopoïétique (Crozatier et al., 1999).

Dans un premier temps, par des expériences de double marquage, j'ai situé le territoire d'apparition de prohémyocytes par rapport aux domaines d'expression des différents gènes précédemment cités. Au stade blastoderme, *btd* et *ems* sont coexprimés avec *srp*, cependant, la résolution des doubles marquages réalisés ne permet pas de déterminer si cette colocalisation est totale ou partielle. Il est important de noter qu'au stade blastoderme, l'expression de ces différents gènes est extrêmement dynamique. Ainsi, au moment où l'expression de *srp* apparaît, l'expression de *col* est restreinte dorsalement et est exclue du territoire *srp*. De même, l'expression antérieure de *slp1* remonte dorsalement mais il semble que *slp1* colocalise avec *srp* dans la région la plus postérieure du territoire (Figure 37).

Dans un deuxième temps, j'ai testé l'influence de la perte de fonction de chacun de ces gènes sur la formation des plasmatocytes et des cellules à cristaux. L'analyse des phénotypes associés à ces différents contextes mutants, n'a pas permis de mettre en évidence de phénotypes spécifiquement associés aux cellules à cristaux, comme nous l'avions espéré précédemment. Cette analyse ne nous a donc pas permis de mettre en évidence l'existence d'une subdivision du domaine hématopoïétique responsable du contrôle précoce de l'étape de ségrégation.

Cependant je souhaite revenir sur l'influence de ces gènes de segmentation de la tête sur la formation des lignages hématopoïétiques au stade embryonnaire.

✓ Influence de *col*

Au stade larvaire, il semble que Col joue un rôle important dans la formation des lamellocytes (Crozatier et al., 2004). Au stade embryonnaire, ce lignage sanguin n'est pas produit et la perte de fonction de *col* ne perturbe pas la formation des hémyocytes

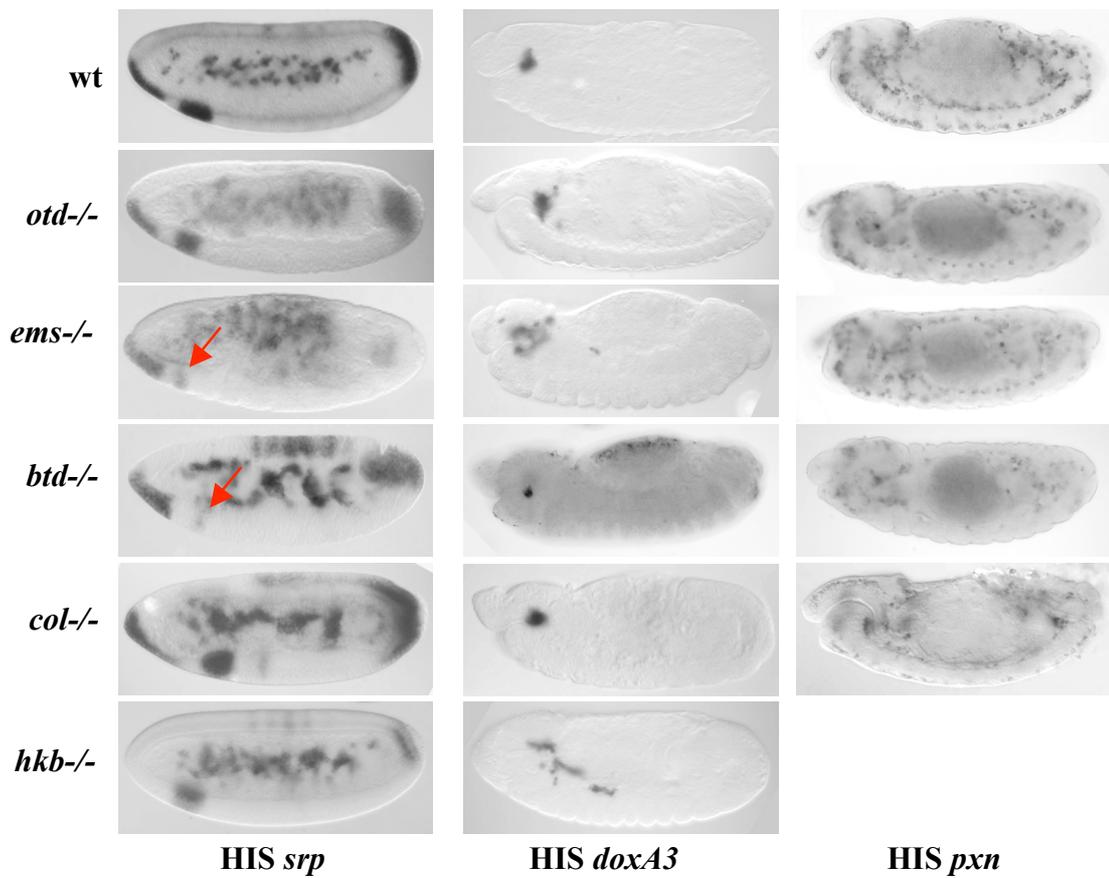


Figure 38 : Influence des gènes du patterning de la tête sur la formation des hémocytes. Les différents génotypes et les marquages réalisés sont reportés sur la figure. Noter la diminution de taille du territoire *srp* en contexte mutant pour *ems* et *btd* (flèche).

embryonnaires (Figure 38). Cette donnée est en accord avec un rôle spécifique de *col* lors de la seconde vague d'hématopoïèse.

✓ *Influence des gènes gap-like otd et slp1/slp2*

otd n'est pas exprimé dans le territoire de formation des prohémyocytes et l'absence de ce gène n'influe pas sur la formation des hémyocytes. L'absence de *slp1/slp2* entraîne de sévères défauts de développement de l'embryon, cependant il semble que les cellules à cristaux et les plasmacytes soient formés normalement.

✓ *Influence des gènes gap-like ems et btd*

Comme décrit précédemment par Yin et al. (Yin et al., 1997), en absence de *btd*, l'expression de *srp* est drastiquement restreinte et transitoire. En contexte *btd*^{-/-}, le nombre total d'hémyocytes est fortement réduit. Il est surprenant de constater que, malgré la forte diminution de taille du territoire *srp*⁺, les deux populations sont formées ce qui suggère que les plasmacytes et les cellules à cristaux émergent de ce territoire quelle que soit la taille de ce domaine. Cette observation est corrélée par l'analyse de mutants *bicoïd* (*bcd*). En effet, l'augmentation de dose de *bcd* (4 ou 6 doses de *bcd*) se traduit par une augmentation proportionnelle de la taille du territoire *srp*⁺, l'effet opposé étant obtenu par diminution de la dose de *bcd*. Dans ces différents contextes, l'augmentation ou la diminution de taille du territoire *srp*⁺ se traduit par une variation analogue du nombre de cellules sanguines différenciées. Le nombre de prohémyocytes spécifiés précocement semble donc strictement corrélé au nombre de cellules à cristaux et de plasmacytes.

ems et *btd* sont coexprimés au moins partiellement avec *srp*. La taille du territoire *srp* est réduite dans ces deux contextes mutants, cependant les phénotypes associés aux hémyocytes différenciés sont clairement différents. En effet, la perte de fonction de *ems* induit une augmentation du nombre de cellules à cristaux et la population de plasmacytes semble réduite. L'ensemble de ces données montre d'une part, que l'expression de *srp* est régulée précocement par deux gènes du patterning de la tête, *btd* et *ems* et, d'autre part, que *ems* pourrait être impliqué dans la régulation de la formation des cellules à cristaux. Cependant, il ne semble pas que *ems* soit suffisant pour expliquer la ségrégation précoce des deux populations d'hémyocytes puisque la perte de fonction de *ems* n'est pas suffisante pour diriger toute la population des prohémyocytes vers une différenciation en cellules à cristaux. L'analyse d'un double mutant *ems btd* permettra éventuellement de mieux comprendre comment *srp* est

régulé précocement et comment les différents types d'hémocytes sont spécifiés au sein de ce territoire.

De Iaco et al. ont montré que *Hkb* régule l'expression de *Gcm* lors du développement des cellules gliales (De Iaco et al., 2006). Au cours de l'hématopoïèse, *hkb* et *gcm* ne sont pas coexprimés dans les hémocytes. Cependant au stade 7, le territoire endodermique antérieur *hkb*⁺ est situé à proximité du territoire hématopoïétique *srp*⁺ et des résultats préliminaires montrent que la perte de fonction de *hkb* induit une augmentation du nombre de cellules à cristaux (Figure 38). L'analyse précise de la fonction de *hkb* permettra de mieux comprendre le rôle éventuel de ce facteur au cours de l'hématopoïèse embryonnaire.

Bien que nos données concernant la ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires suggèrent l'existence d'une subdivision antéropostérieure du territoire hématopoïétique, nous n'avons pas pu identifier les facteurs responsables de cette subdivision. L'analyse des promoteurs de *gcm* et de *lz* pourrait éventuellement permettre d'identifier les mécanismes qui régulent précocement l'expression de ces gènes.

V. Conclusion

Chez l'homme, le système hématopoïétique adulte produit environ un trillion de cellules sanguines par jour (10^{18}). Ce processus permanent implique des étapes successives de restriction des potentialités des cellules, de prolifération et des étapes de différenciation. De nombreux travaux ont mis en évidence que des facteurs de transcription lignages spécifiques sont impliqués dans la régulation de l'engagement des cellules vers un destin spécifique (Kluger et al., 2004). Bien que la régulation des différentes étapes de ségrégation des populations sanguines soit encore assez mal comprise, deux cas de ségrégations, que je souhaite présenter maintenant, ont été particulièrement bien analysés.

Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence que la voie de signalisation Notch régule la spécification des précurseurs des lymphocytes T lors du choix binaire entre lymphocytes T *versus* B. L'inactivation de Notch1 dans les progéniteurs lymphoïdes bloque le développement des lymphocytes T et induit la formation de cellules B immatures (Radtke et al., 1999; Wilson et al., 2001). Réciproquement, l'activation constitutive de la voie Notch

dans les progéniteurs de la moelle osseuse, induit le développement ectopique de lymphocytes T et bloque la formation des lymphocytes B (Pui et al., 1999). Bien qu'il n'ait jamais été démontré que les lymphocytes T et B proviennent d'une même cellule bipotente, il est proposé que Notch contrôle le choix binaire entre ces deux destins.

Un autre exemple de ségrégation concerne le choix de destin entre les précurseurs érythroïdes et les précurseurs myéloïdes à l'origine des monocytes, granulocytes et basophiles. Ce choix de destin est contrôlé par un antagonisme réciproque entre le facteur GATA-1 et le facteur Ets, PU.1 (Cantor and Orkin, 2001). Ces deux facteurs lignages spécifiques sont requis respectivement pour la formation des précurseurs érythroïdes et des précurseurs myéloïdes. Chez la souris, la surexpression de PU.1 dans les cellules érythroïdes provoque une leucémie érythroïde sévère. A l'inverse, la surexpression de GATA-1 dans les cellules myélo-monocytiques bloque leur différenciation. Cette inhibition réciproque entre GATA-1 et PU.1 semble passer par l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription. En effet, comme décrit précédemment (Figure 23), la formation d'un complexe GATA-1/PU.1 empêche l'activation des cibles respectives de GATA-1 ou de PU.1. Cette régulation croisée entre PU.1 et GATA-1 permet donc de réguler le choix entre deux destins différents. Ces données ont permis de proposer que ce modèle de ségrégation par inhibition réciproque entre facteurs lignages spécifiques soit impliqué dans d'autres choix de destins au cours de l'hématopoïèse chez les vertébrés.

Chez la Drosophile, nous avons mis en évidence *in vivo* que la ségrégation des deux lignages sanguins embryonnaires, plasmacytes et cellules à cristaux, à partir d'une population de prohématocytes bipotents est un processus contrôlé par un mécanisme original en deux étapes. Cette régulation qui fait intervenir les facteurs de transcription lignage-spécifiques Lozenge et Glial-Cell-Missing (Gcm) et Gcm2, contrôle précocement la détermination des précurseurs et tardivement le maintien de l'identité de ces cellules dans les phases de différenciation en cellules à cristaux *versus* plasmacytes. De manière intéressante, nous avons montré que la régulation de la ségrégation, n'est basée ni sur un processus dépendant de la voie de signalisation Notch, ni sur un antagonisme réciproque entre ces facteurs de transcription lignage-spécifiques. Ce mécanisme qui contrôle l'acquisition d'un destin cellulaire diffère donc des processus de régulation de l'hématopoïèse mis en évidence chez les mammifères.

- DISCUSSION GENERALE -

L'ensemble des travaux présentés précédemment, permet de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent le déroulement de l'hématopoïèse embryonnaire.

- L'étude du mode d'action du facteur de transcription GATA Serpent a permis de mettre en évidence le rôle de ce facteur à différentes étapes de l'hématopoïèse, notamment lors de la différenciation des deux populations sanguines, plasmacytes et des cellules à cristaux.
- L'étude de l'étape de ségrégation des deux populations d'hémocytes embryonnaires a permis de mettre à jour les mécanismes qui contrôlent l'engagement des pro-hémocytes vers un destin spécifique.

I. Recherche de nouveaux régulateurs de l'hématopoïèse embryonnaire

Actuellement, on ne connaît qu'un nombre restreint de gènes qui participent au contrôle de l'hématopoïèse embryonnaire. Au cours de ma thèse, j'ai entrepris plusieurs analyses afin de caractériser d'autres gènes impliqués dans le contrôle de ce processus. Ainsi, j'ai réalisé plusieurs approches de type gène candidat. D'une part, l'étude du gène *CG17100*, qui code pour un facteur de transcription de type bHLH, exprimé dans le territoire hématopoïétique était basée sur l'analogie entre les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse chez la Drosophile et chez les vertébrés où le facteur bHLH SCL/Tal1 joue un rôle essentiel (Shivdasani et al., 1995). D'autre part, la recherche du signal inducteur de la ségrégation m'a amené à analyser la fonction potentielle de gènes impliqués dans la segmentation de la tête. Cependant, ces approches gènes candidats se sont avérées infructueuses et n'ont pas permis d'identifier de nouveaux régulateurs de l'hématopoïèse embryonnaire.

Afin d'identifier d'autres gènes impliqués dans la régulation de ce processus, une approche plus exhaustive/large pourrait être envisagée. Milchanowski et al. ont ainsi réalisés un crible génétique pour identifier des mutations affectant le développement des cellules à cristaux embryonnaires (Milchanowski et al., 2004). Les auteurs ont identifié quatre classes de gènes qui régulent le développement de ce lignage : des régulateurs de la transcription, des molécules de signalisation impliquées notamment dans les voies Dpp et Toll, des régulateurs

de la prolifération et d'autres facteurs divers. Il est intéressant de noter que, de façon très intrigante, hormis le mutant *srp*, aucun mutant analysé dans ce crible ne conduit à une absence totale de cellules à cristaux. Les mécanismes qui régulent l'induction de la ségrégation des deux lignages hématopoïétiques embryonnaires restent donc inconnus actuellement.

Comme chez les vertébrés, une seconde vague d'hématopoïèse a lieu au cours du développement de la *Drosophile*. Je souhaite discuter brièvement de la conservation des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse embryonnaire et de l'hématopoïèse larvaire.

II. Régulation de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire

Si les relations de lignages entre les hémocytes sont établies au stade embryonnaire, la situation est beaucoup moins claire lors de l'hématopoïèse larvaire. La glande lymphatique correspond à une structure complexe. D'une part, cet organe est régionalisé en trois zones distinctes, une zone médullaire, une zone corticale et un PSC. Des données préliminaires suggèrent que les cellules de la zone corticale qui correspondent aux cellules en voie de différenciation proviennent de la zone médullaire considérée comme un réservoir de prohématocytes indifférenciés (Jung et al., 2005). D'autre part, cet organe est capable de répondre à une situation de challenge immun en générant spécifiquement, en plus des plasmacytes et des cellules à cristaux, un troisième type cellulaire. Actuellement on ne sait pas quelles sont les relations de lignages entre ces trois types cellulaires. Notamment, on ne sait pas si, comme au stade embryonnaire, certains progéniteurs Lz^+ se différencient en plasmacytes, ni si l'ensemble des prohématocytes situés dans la zone médullaire sont des progéniteurs uni- bi- ou tri-potents. L'analyse des relations de lignage entre ces différentes populations hématopoïétiques devrait permettre de mieux comprendre quelle est la nature des transformations observées dans les différents contextes mutant ou dans les différentes conditions immunes.

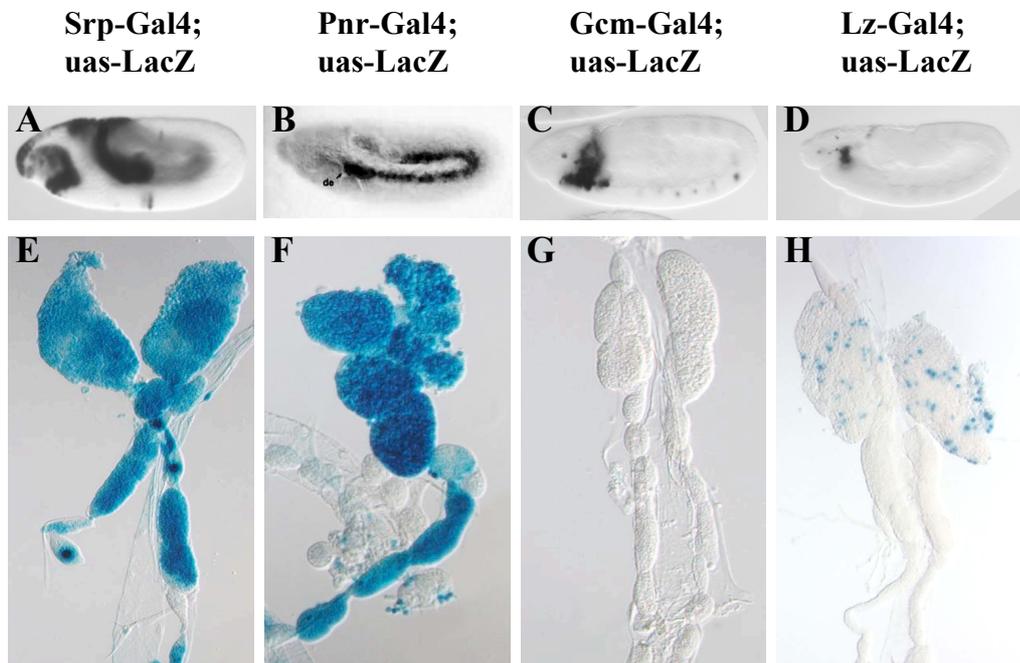


Figure 39 : Expression de différents marqueurs au stade embryonnaire et dans la glande lymphatique. Les génotypes sont mentionnés sur la figure. (A-D) Hybridation in situ contre *lacZ* sur des embryons de stade 10 de différents génotypes. (E-H) visualisation de l'expression de LacZ dans la glande lymphatique par coloration X-Gal sur des larves de stade L3. On distingue les lobes primaires (antérieur en haut) et les lobes secondaires de taille inférieure.

De plus, un certain nombre de données suggèrent que les mécanismes de contrôle de l'hématopoïèse larvaire sont au moins partiellement différents des mécanismes de contrôle de l'hématopoïèse embryonnaire :

- (1) Nous avons montré qu'au stade embryonnaire, seul le facteur GATA Srp est exprimé dans les hémocytes. *srp* est aussi exprimé dans la glande lymphatique (Jung et al., 2005; Lebestky et al., 2000), mais plusieurs études suggèrent que *pnr* pourrait être exprimé au moins précocément dans la glande (Han and Olson, 2005; Mandal et al., 2004). De plus, l'analyse du patron d'expression du driver *pnr-gal4* montre qu'au stade L3, ce driver est exprimé de manière ubiquitaire dans la glande (Figure 39 F). Ceci soutient donc l'hypothèse qu'au stade larvaire *srp* et *pnr* sont tous deux exprimés dans la glande lymphatique. Le rôle de ces deux facteurs GATA, Srp et Pnr dans le contrôle de cette seconde vague d'hématopoïèse reste à définir.
- (2) La formation des plasmacytes dans la glande semble dépendre d'un mécanisme différent de celui qui régule leur formation au stade embryonnaire. En effet, lors de l'hématopoïèse embryonnaire, *gcm* et *gcm2* régulent la formation de ce lignage (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997). Nous avons mis en évidence au laboratoire que, de manière inattendue, ni *gcm* ni *gcm2* ne sont exprimés dans la glande lymphatique (Romain DUBOURDIEU, communication personnelle) (Figure 39 G). D'autre part, il a été montré qu'à ce stade, la différenciation des plasmacytes dépend de PVR (Jung et al., 2005). Les mécanismes qui contrôlent la formation des plasmacytes semblent donc différents au cours de chaque vague d'hématopoïèse.
- (3) La régulation de la formation des cellules à cristaux semble aussi différer entre le stade embryonnaire et larvaire. En effet, au stade embryonnaire, *lz* est régulé par Gcm mais pas par Notch, alors qu'au stade larvaire, il a été démontré que l'expression de *lz* est induite par Notch (Lebestky et al., 2003). L'analyse du promoteur de *lz* pourrait permettre de mettre en évidence des modules de régulations spécifiques de l'hématopoïèse embryonnaire ou larvaire et de mieux comprendre comment ce facteur est régulé au cours du développement.
- (4) Enfin, la capacité de la glande à générer des lamellocytes en réponse à une infection implique l'existence d'un niveau de régulation plus complexe. Les mécanismes de contrôle de la formation des lamellocytes ne sont que très partiellement caractérisés. Le facteur de transcription Collier est proposé pour intervenir dans la régulation de la production ce lignage. De manière intéressante, nous avons montré que *col*

n'intervient pas dans la régulation de l'hématopoïèse embryonnaire au cours de laquelle aucun lamellocyte n'est produit.

L'ensemble de ces éléments suggère donc que la première vague et la seconde vague d'hématopoïèse diffèrent par de nombreux aspects, tant au niveau de la complexité des systèmes qu'au niveau des mécanismes de régulation. Un des objectifs sera donc de caractériser plus précisément cette seconde vague d'hématopoïèse et de déterminer l'importance de la conservation des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse au cours du développement de l'organisme.

III. Comparaison entre l'hématopoïèse chez la Drosophile et chez les vertébrés

De nombreuses données montrent que les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse sont au moins partiellement conservés au cours de l'évolution de la Drosophile aux vertébrés. Cependant, il existe un certain nombre de différences fondamentales entre ces deux processus.

A. La notion de cellule souche

Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) sont les cellules souches les plus étudiées chez les mammifères depuis 30 ans où elles ont été identifiées par des expériences cliniques où après un traitement myélo-ablatif, les HSCs adultes et néonatales sont capables de reconstituer le système hématopoïétique des patients. Chez les vertébrés, toutes les cellules sanguines dérivent de ces HSCs pluripotentes. De manière similaire, nous avons montré que chez la Drosophile, au stade embryonnaire, les prohémoctes sont des précurseurs bipotents qui ont la capacité de se différencier soit en cellules à cristaux soit en plasmatoctes. Cependant, chez les vertébrés, les cellules souches hématopoïétiques sont caractérisées par deux critères : leur capacité à générer tous les types cellulaires mais aussi par leur capacité d'autorenouvellement. Chez la Drosophile, ce dernier critère n'a jamais été mis en évidence, et il ne semble pas qu'un pool de prohémoctes soit maintenu au cours du développement de l'organisme. Les prohémoctes ne peuvent donc pas actuellement être considérés comme des cellules souches à proprement parler. On notera toutefois que chez la Drosophile, les cellules

déjà engagées dans un destin spécifique conservent une activité proliférative importante. Ainsi, il a été montré qu'au stade larvaire les plasmacytes et les cellules à cristaux présents en circulation prolifèrent activement au cours du développement larvaire (Holz et al., 2003; Lanot et al., 2001). Actuellement, on ne sait pas si toutes ces cellules ont une capacité proliférative équivalente ou s'il existe des sous-populations cellulaires spécifiquement impliquées dans l'amplification du pool de cellules sanguines. De plus, on ne sait pas si la prolifération des hémocytes circulants au stade larvaire correspond à une expansion clonale des cellules ou si plusieurs types cellulaires peuvent être générés à partir d'une même cellule mère.

B. Influence de l'environnement sur l'hématopoïèse

Bien que les HSCs puissent être conservées *in vitro* en présence d'un stroma adéquat, ces cellules ne peuvent être maintenues au delà d'une période de quelques semaines. Cette observation a soulevé une nouvelle question : Quelle est l'influence de l'environnement sur le maintien des HSCs et le destin de leurs cellules filles. Des données récentes ont mis en évidence que chez les vertébrés, les cellules souches HSCs forment un pool de cellules en contact étroit avec le microenvironnement stromal qui constitue une « niche ». Cette niche joue un rôle essentiel d'une part sur le maintien des cellules HSC à l'état quiescent et d'autre part sur la différenciation des lignages (Haylock and Nilsson, 2005; Heissig et al., 2005; Yin and Li, 2006). Ainsi, chez l'adulte, dans la moelle osseuse, les ostéoblastes responsables de l'ostéogenèse sont en association étroite avec les cellules hématopoïétiques. Récemment il a été démontré qu'une sous-population d'ostéoblastes constitue un composant clé de la niche. De plus, il a été montré que les cellules de la niche produisent des molécules de signalisation, de matrice extra cellulaire et des molécules d'adhésions et régulent la taille de la population HSC (Arai et al., 2005).

Chez la *Drosophile*, il n'y a actuellement aucune donnée mettant en évidence l'existence d'une « niche » ou même mettant en évidence l'influence d'un microenvironnement sur la prolifération ou la différenciation des pro-hémocytes. Au stade embryonnaire, cette notion semble difficilement concevable étant donné qu'on s'adresse à des cellules dispersées. Cependant, lors de l'hématopoïèse larvaire, la glande lymphatique est structurée en différentes zones. Actuellement, ni la composition cellulaire ni le rôle du PSC ne

sont clairement établis. Il est proposé que le PSC joue un rôle signalisateur impliqué dans la production des lamellocytes en réponse à un parasitisme (Crozatier et al., 2004). Mais il est aussi envisageable que cette zone joue un rôle de « niche », en maintenant les prohémyocytes de la zone médullaire à l'état quiescent en conditions normales. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'en absence de PSC, on observe une différenciation massive de cellules à cristaux (Crozatier et al., 2004). L'analyse approfondie des phénotypes associés à l'absence de PSC pourrait permettre de déterminer si cette zone est nécessaire au maintien de la population de prohémyocytes, auquel cas ce territoire pourrait jouer un rôle similaire à la niche chez les vertébrés.

IV. Conclusion

L'étude de l'hématopoïèse embryonnaire permet d'illustrer le fait que l'acquisition d'un destin cellulaire au cours du développement correspond à un processus dynamique. Cette étude met en évidence l'importance de la caractérisation des relations de lignages lorsqu'on s'intéresse à un processus d'acquisition d'un destin et donc l'importance de l'analyse descriptive des systèmes développementaux. D'autre part, cette étude permet d'insister sur un concept important qui concerne la fonction des facteurs de transcription. En effet, la complexité des mécanismes de régulation dans lesquels Srp intervient, démontre que la fonction d'un facteur de transcription ne peut pas être considérée sans prendre en compte la régulation de son activité par des cofacteurs. Cette notion permet d'ajouter un niveau de complexité supérieur dans les mécanismes de contrôle des processus développementaux.

**- REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES -**

- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. and Steller, H.** (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A. et al.** (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306.
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. and Perrimon, N.** (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* **5**, 441-50.
- Alfonso, T. B. and Jones, B. W.** (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* **248**, 369-83.
- Alvarez, A. D., Shi, W., Wilson, B. A. and Skeath, J. B.** (2003). *pannier* and *pointedP2* act sequentially to regulate *Drosophila* heart development. *Development* **130**, 3015-26.
- Arai, F., Hirao, A. and Suda, T.** (2005). Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int J Hematol* **82**, 371-6.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I. and Dearolf, C. R.** (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* **163**, 203-15.
- Bangs, P., Franc, N. and White, K.** (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **7**, 1027-34.
- Bangs, P. and White, K.** (2000). Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev Dyn* **218**, 68-79.
- Bartholdy, B. and Matthias, P.** (2004). Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* **327**, 1-23.
- Bernardoni, R., Vivancos, V. and Giangrande, A.** (1997). *glide/gcm* is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev Biol* **191**, 118-30.
- Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U. and Dushay, M. S.** (2005). Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol* **29**, 669-79.
- Bollerot, K., Pouget, C. and Jaffredo, T.** (2005). The embryonic origins of hematopoietic stem cells: a tale of hemangioblast and hemogenic endothelium. *Apmis* **113**, 790-803.

- Braun, A., Hoffmann, J. A. and Meister, M.** (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14337-42.
- Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C.** (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* **11**, 1700-5.
- Bruckner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C. M., Rorth, P. and Perrimon, N.** (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev Cell* **7**, 73-84.
- Busslinger, M., Nutt, S. L. and Rolink, A. G.** (2000). Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* **12**, 151-8.
- Canon, J. and Banerjee, U.** (2000). Runt and Lozenge function in *Drosophila* development. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 327-36.
- Canon, J. and Banerjee, U.** (2003). In vivo analysis of a developmental circuit for direct transcriptional activation and repression in the same cell by a Runx protein. *Genes Dev* **17**, 838-43.
- Cantor, A. B. and Orkin, S. H.** (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 513-9.
- Cantor, A. B. and Orkin, S. H.** (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* **21**, 3368-76.
- Carton, Y. and David, J. R.** (1985). Relation between the genetic variability of digging behavior of *Drosophila* larvae and their susceptibility to a parasitic wasp. *Behav Genet* **15**, 143-54.
- Carton, Y. and Nappi, A. J.** (1997). *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol Today* **13**, 218-27.
- Cerenius, L. and Soderhall, K.** (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* **198**, 116-26.
- Chang, A. N., Cantor, A. B., Fujiwara, Y., Lodish, M. B., Droho, S., Crispino, J. D. and Orkin, S. H.** (2002). GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9237-42.
- Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S. and Hou, S. X.** (2002). *mom* identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev* **16**, 388-98.

- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F. and Krasnow, M. A.** (2002). Developmental control of blood cell migration by the Drosophila VEGF pathway. *Cell* **108**, 865-76.
- Cohen, S. M. and Jurgens, G.** (1990). Mediation of Drosophila head development by gap-like segmentation genes. *Nature* **346**, 482-5.
- Crispino, J. D., Lodish, M. B., MacKay, J. P. and Orkin, S. H.** (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell* **3**, 219-28.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M.** (2004). Cellular immune response to parasitization in Drosophila requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol* **2**, E196.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibnsouda, S. and Vincent, A.** (1999). Head versus trunk patterning in the Drosophila embryo; collier requirement for formation of the intercalary segment. *Development* **126**, 4385-94.
- Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997). u-shaped encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes achaete and scute during the formation of bristles in Drosophila. *Genes Dev* **11**, 3083-95.
- Dalton, D., Chadwick, R. and McGinnis, W.** (1989). Expression and embryonic function of empty spiracles: a Drosophila homeo box gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. *Genes Dev* **3**, 1940-56.
- Davidson, C. J., Tirouvanziam, R., Herzenberg, L. A. and Lipsick, J. S.** (2005). Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements Drosophila Myb in hemocytes. *Genetics* **169**, 215-29.
- De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. L., Iwanaga, S., Lemaitre, B. and Brey, P. T.** (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in Drosophila. *Dev Cell* **3**, 581-92.
- De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C. and Giangrande, A.** (2006). Hucklebein-mediated autoregulation of Glide/Gcm triggers glia specification. *Embo J* **25**, 244-54.
- Dearolf, C. R.** (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta* **1377**, M13-23.
- Dumortier, A., Wilson, A., MacDonald, H. R. and Radtke, F.** (2005). Paradigms of notch signaling in mammals. *Int J Hematol* **82**, 277-84.

- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M. and Royet, J.** (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr Biol* **12**, 1923-7.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 177-87.
- Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* **5**, 673-90.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M.** (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90.
- Finkelstein, R. and Perrimon, N.** (1990). The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Nature* **346**, 485-8.
- Foe, V. E.** (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**, 1-22.
- 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**, 1747-58.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S. H. and Schulz, R. A.** (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11451-6.
- Fossett, N. and Schulz, R. A.** (2001). Functional conservation of hematopoietic factors in *Drosophila* and vertebrates. *Differentiation* **69**, 83-90.
- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H. and Schulz, R. A.** (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7342-7.
- Fossett, N., Zhang, Q., Gajewski, K., Choi, C. Y., Kim, Y. and Schulz, R. A.** (2000). The multitype zinc-finger protein U-shaped functions in heart cell specification in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7348-53.
- Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M.** (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *Embo J* **18**, 2812-22.

- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J. and Ezekowitz, R. A.** (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-43.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. and White, K.** (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**, 1991-4.
- Frank, L. H. and Rushlow, C.** (1996). A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development* **122**, 1343-52.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. and Doe, C. Q.** (2003). Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**, 567-80.
- Gaines, P., Geiger, J. N., Knudsen, G., Seshasayee, D. and Wojchowski, D. M.** (2000). GATA-1- and FOG-dependent activation of megakaryocytic alpha IIB gene expression. *J Biol Chem* **275**, 34114-21.
- Galko, M. J. and Krasnow, M. A.** (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* **2**, E239.
- Gateff, E.** (1977). Malignant neoplasms of the hematopoietic system in three mutants of *Drosophila melanogaster*. *Ann Parasitol Hum Comp* **52**, 81-3.
- Gateff, E.** (1994). Tumor-suppressor genes, hematopoietic malignancies and other hematopoietic disorders of *Drosophila melanogaster*. *Ann N Y Acad Sci* **712**, 260-79.
- Giebel, B., Zhang, T., Beckmann, J., Spanholtz, J., Wernet, P., Ho, A. D. and Punzel, M.** (2006). Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* **107**, 2146-52.
- Goldman-Levi, R., Miller, C., Greenberg, G., Gabai, E. and Zak, N. B.** (1996). Cellular pathways acting along the germband and in the amnioserosa may participate in germband retraction of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Int J Dev Biol* **40**, 1043-51.
- Goto, A., Kadowaki, T. and Kitagawa, Y.** (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol* **264**, 582-91.
- Goto, A., Kumagai, T., Kumagai, C., Hirose, J., Narita, H., Mori, H., Kadowaki, T., Beck, K. and Kitagawa, Y.** (2001). A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. *Biochem J* **359**, 99-108.
- Grossniklaus, U., Cadigan, K. M. and Gehring, W. J.** (1994). Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. *Development* **120**, 3155-71.

- 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**, 1030-51.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P. and Romain, P.** (1997). Transcriptional activity of *pannier* is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of *Drosophila*. *Genes Dev* **11**, 3096-108.
- Han, Z. and Olson, E. N.** (2005). Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development* **132**, 3525-36.
- Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T. and Okamoto, H.** (2004). Zebrafish *gcmb* is required for pharyngeal cartilage formation. *Mech Dev* **121**, 1235-47.
- Harper, J. A., Yuan, J. S., Tan, J. B., Visan, I. and Guidos, C. J.** (2003). Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* **64**, 461-72.
- Hayes, S. A., Miller, J. M. and Hoshizaki, D. K.** (2001). *serpent*, a GATA-like transcription factor gene, induces fat-cell development in *Drosophila melanogaster*. *Development* **128**, 1193-200.
- Haylock, D. N. and Nilsson, S. K.** (2005). Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle* **4**, 1353-5.
- Heissig, B., Ohki, Y., Sato, Y., Rafii, S., Werb, Z. and Hattori, K.** (2005). A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology* **10**, 247-53.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R.** (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* **130**, 4955-62.
- Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J. and Keller, G.** (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* **432**, 625-30.
- Ichikawa, M., Asai, T., Chiba, S., Kurokawa, M. and Ogawa, S.** (2004). Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle* **3**, 722-4.
- Izon, D. J., Punt, J. A. and Pear, W. S.** (2002). Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* **14**, 192-9.
- Jackle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. and Bronner, G.** (1992). Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J Cell Sci Suppl* **16**, 39-51.
- Jackson Behan, K., Fair, J., Singh, S., Bogwitz, M., Perry, T., Grubor, V., Cunningham, F., Nichols, C. D., Cheung, T. L., Batterham, P. et al.** (2005). Alternative splicing removes

an Ets interaction domain from Lozenge during Drosophila eye development. *Dev Genes Evol* **215**, 423-35.

Jones, B. W. (2005). Transcriptional control of glial cell development in Drosophila. *Dev Biol* **278**, 265-73.

Jones, B. W., Abeysekera, M., Galinska, J. and Jolicoeur, E. M. (2004). Transcriptional control of glial and blood cell development in Drosophila: cis-regulatory elements of glial cells missing. *Dev Biol* **266**, 374-87.

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**, 1013-23.

Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C. and Banerjee, U. (2005). The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132**, 2521-33.

Kambris, Z., Hoffmann, J. A., Imler, J. L. and Capovilla, M. (2002). Tissue and stage-specific expression of the Tolls in Drosophila embryos. *Gene Expr Patterns* **2**, 311-7.

Kammerer, M. and Giangrande, A. (2001). Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster. *Embo J* **20**, 4664-73.

Kluger, Y., Lian, Z., Zhang, X., Newburger, P. E. and Weissman, S. M. (2004). A panorama of lineage-specific transcription in hematopoiesis. *Bioessays* **26**, 1276-87.

Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M. et al. (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila. *Cell* **123**, 335-46.

Kramerova, I. A., Kramerov, A. A. and Fessler, J. H. (2003). Alternative splicing of papilin and the diversity of Drosophila extracellular matrix during embryonic morphogenesis. *Dev Dyn* **226**, 634-42.

Kumano, K., Chiba, S., Shimizu, K., Yamagata, T., Hosoya, N., Saito, T., Takahashi, T., Hamada, Y. and Hirai, H. (2001). Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood* **98**, 3283-9.

Kurucz, E., Zettervall, C. J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedus, Z., Ando, I. and Hultmark, D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2622-7.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in Drosophila. *Dev Biol* **230**, 243-57.

Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. and Banerjee, U. (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-9.

- Lebestky, T., Jung, S. H. and Banerjee, U.** (2003). A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis. *Genes Dev* **17**, 348-53.
- Lowry, J. A. and Atchley, W. R.** (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol* **50**, 103-15.
- Lowry, J. A. and Mackay, J. P.** (2006). GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 6-11.
- Luo, H., Hanratty, W. P. and Dearolf, C. R.** (1995). An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J* **14**, 1412-20.
- Luo, H., Rose, P. E., Roberts, T. M. and Dearolf, C. R.** (2002). The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in Drosophila. *Mol Genet Genomics* **267**, 57-63.
- Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P. and Nakanishi, Y.** (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* **279**, 48466-76.
- Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* **36**, 1019-23.
- Martin, D. I. and Orkin, S. H.** (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev* **4**, 1886-98.
- Meister, M.** (2004). Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* **16**, 10-5.
- Meister, M. and Lagueux, M.** (2003). Drosophila blood cells. *Cell Microbiol* **5**, 573-80.
- Merika, M. and Orkin, S. H.** (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* **13**, 3999-4010.
- Milchanowski, A. B., Henkenius, A. L., Narayanan, M., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2004). Identification and characterization of genes involved in embryonic crystal cell formation during Drosophila hematopoiesis. *Genetics* **168**, 325-39.
- Miller, A. A., Bernardoni, R. and Giangrande, A.** (1998). Positive autoregulation of the glial promoting factor glide/gcm. *Embo J* **17**, 6316-26.
- Molkentin, J. D.** (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **275**, 38949-52.

- Morceau, F., Schnekenburger, M., Dicato, M. and Diederich, M.** (2004). GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci* **1030**, 537-54.
- Murakami, R., Okumura, T. and Uchiyama, H.** (2005). GATA factors as key regulatory molecules in the development of Drosophila endoderm. *Dev Growth Differ* **47**, 581-9.
- Naitza, S. and Ligoxygakis, P.** (2004). Antimicrobial defences in Drosophila: the story so far. *Mol Immunol* **40**, 887-96.
- Nappi, A. J., Frey, F. and Carton, Y.** (2005). Drosophila serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *J Insect Physiol* **51**, 197-205.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y.** (1995). Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* **68**, 450-6.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y.** (2000). Nitric oxide involvement in Drosophila immunity. *Nitric Oxide* **4**, 423-30.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. and Fessler, J. H.** (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. *Embo J* **13**, 3438-47.
- Nishikawa, S. I.** (2001). A complex linkage in the developmental pathway of endothelial and hematopoietic cells. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 673-8.
- Olofsson, B. and Page, D. T.** (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic Drosophila is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**, 233-43.
- Orkin, S. H., Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y. and McDevitt, M. A.** (1998). Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells* **16 Suppl 2**, 79-83.
- Paladi, M. and Tepass, U.** (2004). Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in Drosophila. *J Cell Sci* **117**, 6313-26.
- Pearson, A., Lux, A. and Krieger, M.** (1995). Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4056-60.
- Peyrefitte, S., Kahn, D. and Haenlin, M.** (2001). New members of the Drosophila Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix-loop-helix genes. *Mech Dev* **104**, 99-104.
- Portin, P.** (2002). General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in Drosophila melanogaster: a review. *Hereditas* **136**, 89-96.

- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C. et al.** (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299-308.
- Qiu, P., Pan, P. C. and Govind, S.** (1998). A role for the Drosophila Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* **125**, 1909-20.
- Querfurth, E., Schuster, M., Kulesa, H., Crispino, J. D., Doderlein, G., Orkin, S. H., Graf, T. and Nerlov, C.** (2000). Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* **14**, 2515-25.
- Radtke, F., Wilson, A. and MacDonald, H. R.** (2005). Notch signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis: lessons from Drosophila. *Bioessays* **27**, 1117-28.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M.** (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-58.
- Ragone, G., Van De Bor, V., Sorrentino, S., Kammerer, M., Galy, A., Schenck, A., Bernardoni, R., Miller, A. A., Roy, N. and Giangrande, A.** (2003). Transcriptional regulation of glial cell specification. *Dev Biol* **255**, 138-50.
- Ramain, P., Khechumian, R., Khechumian, K., Arbogast, N., Ackermann, C. and Heitzler, P.** (2000). Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning. *Mol Cell* **6**, 781-90.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. and Ezekowitz, R. A.** (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for E. coli. *Nature* **416**, 644-8.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M. and Ezekowitz, R. A.** (2001). Drosophila scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* **15**, 1027-38.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M. and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and Drosophila. *Development* **122**, 4023-31.
- Rekhtman, N., Choe, K. S., Matushansky, I., Murray, S., Stopka, T. and Skoultschi, A. I.** (2003). PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 7460-74.
- Rizki, T. M., Rizki, R. M. and Bellotti, R. A.** (1985). Genetics of a Drosophila phenoloxidase. *Mol Gen Genet* **201**, 7-13.

- Rizki, T. M., Rizki, R. M. and Carton, Y.** (1990). *Leptopilina heterotoma* and *L. bouleardi*: strategies to avoid cellular defense responses of *Drosophila melanogaster*. *Exp Parasitol* **70**, 466-75.
- Roegiers, F. and Jan, Y. N.** (2004). Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 195-205.
- Roignant, J. Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J. A. and Antoniewski, C.** (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *Rna* **9**, 299-308.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y. and Brehelin, M.** (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina bouleardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* **112 (Pt 1)**, 135-42.
- Scherfer, C., Karlsson, C., Loseva, O., Bidla, G., Goto, A., Havemann, J., Dushay, M. S. and Theopold, U.** (2004). Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol* **14**, 625-9.
- Schubert, S. W., Kardash, E., Khan, M. A., Cheusova, T., Kilian, K., Wegner, M. and Hashemolhosseini, S.** (2004). Interaction, cooperative promoter modulation, and renal colocalization of GCMa and Pitx2. *J Biol Chem* **279**, 50358-65.
- Sears, H. C., Kennedy, C. J. and Garrity, P. A.** (2003). Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* **130**, 3557-65.
- Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M.** (2001). In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *Embo J* **20**, 5250-60.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L. and Orkin, S. H.** (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature* **373**, 432-4.
- Soderhall, K. and Cerenius, L.** (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 23-8.
- Sorrentino, R. P., Carton, Y. and Govind, S.** (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* **243**, 65-80.
- Sorrentino, R. P., Gajewski, K. M. and Schulz, R. A.** (2005). GATA factors in *Drosophila* heart and blood cell development. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 107-16.
- Sorrentino, R. P., Melk, J. P. and Govind, S.** (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* **166**, 1343-56.

- Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M. and Martin, P.** (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol* **168**, 567-73.
- Takagi, M.** (2005). Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. *J Biosci Bioeng* **99**, 189-96.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-37.
- Trainor, C. D., Ghirlando, R. and Simpson, M. A.** (2000). GATA zinc finger interactions modulate DNA binding and transactivation. *J Biol Chem* **275**, 28157-66.
- Trainor, C. D., Omichinski, J. G., Vandergon, T. L., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. and Felsenfeld, G.** (1996). A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol Cell Biol* **16**, 2238-47.
- Traver, D. and Zon, L. I.** (2002). Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* **108**, 731-4.
- Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B. and Orkin, S. H.** (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* **12**, 1176-88.
- Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M. and Orkin, S. H.** (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **90**, 109-19.
- Van De Bor, V. and Giangrande, A.** (2002). glide/gcm: at the crossroads between neurons and glia. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 465-72.
- Vercauteren, S. M. and Sutherland, H. J.** (2004). Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo. *Blood* **104**, 2315-22.
- Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A. and Rabbitts, T. H.** (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* **16**, 3145-57.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L. and Haenlin, M.** (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *Embo J* **22**, 6516-25.

- Watson, K. L., Johnson, T. K. and Denell, R. E.** (1991). Lethal(1) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* **12**, 173-87.
- Williams, M. J., Ando, I. and Hultmark, D.** (2005). *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells* **10**, 813-23.
- Wilson, A., MacDonald, H. R. and Radtke, F.** (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* **194**, 1003-12.
- Wimmer, E. A., Simpson-Brose, M., Cohen, S. M., Desplan, C. and Jackle, H.** (1995). Trans- and cis-acting requirements for blastodermal expression of the head gap gene buttonhead. *Mech Dev* **53**, 235-45.
- Yan, H., Canon, J. and Banerjee, U.** (2003). A transcriptional chain linking eye specification to terminal determination of cone cells in the *Drosophila* eye. *Dev Biol* **263**, 323-9.
- Yin, T. and Li, L.** (2006). The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* **116**, 1195-201.
- Yin, Z., Xu, X. L. and Frasch, M.** (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development* **124**, 4971-82.
- Zettervall, C. J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I. and Hultmark, D.** (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14192-7.

Title : Mechanism of regulation of embryonic haematopoiesis in *Drosophila*.

SUMMARY

Haematopoietic development provides an excellent paradigm to address how multipotent cells generate a spectrum of cell types through the combinatorial action of transcription factors. During this process, the blood cells progenitors proliferate and differentiate to give rise to different specialised blood cell types. Despite the evolutionary distance between *Drosophila* and vertebrates, many of the molecular pathways governing haematopoiesis have been conserved. In particular, transcription factors of the GATA, FOG (Friend Of GATA) and RUNX families, which regulate several steps of haematopoiesis in vertebrates, also control *Drosophila* haematopoiesis. Thus, the fruit fly may provide a valuable model system to gain insight into the mechanisms of blood cell lineage formation *in vivo*. In *Drosophila* embryo, the blood cell progenitors (prohemocytes) give rise to two terminally differentiated cell types : plasmatocytes and crystal cells. We have investigated the mechanisms of regulation of this process during *Drosophila* embryonic development.

First, we have analysed the function and the mechanism of action of the GATA transcription factor Serpent (Srp) that is required for blood cell precursor specification and for the formation of the two populations of blood cells (plasmatocytes and crystal cells). We have shown that *serpent* encodes different isoforms that have different activities during this process. Furthermore we have shown that the activity of Srp is modulated by different cofactors during haematopoiesis. Notably, Srp is able to recruit the FOG cofactor U-Shaped (Ush), and to form a functional complex with the RUNX transcription factor, Lozenge (Lz). The different isoforms of Srp and the cooperation between Srp and different cofactors endow *srp* with pleiotropic functions during haematopoiesis.

Secondly, we have undertaken an *in vivo* analysis of the mechanism of segregation of the two embryonic blood cell lineages. The differentiation of the blood cell progenitors into plasmatocytes or crystal cells is control by lineage-specific transcription factors. The related proteins Glial cells missing (Gcm) and Gcm2 control plasmatocyte development, while the RUNX factor Lozenge (Lz) is specifically required for crystal cell differentiation. We found that prohemocytes are bipotent progenitors, whose fate is determined by a dynamic interplay between the lineage-specific transcription factors, Gcm/Gcm2 and Lz. The resolution of blood cell fate choice corresponds to an original two-steps process in which Gcm/Gcm2 control the initiation and the maintenance of the crystal cell fate. Interestingly, the transition from a bipotent haematopoietic precursor to lineage-restricted precursors in *Drosophila* embryos does not rely on reciprocal antagonism between two lineage-specific transcription factors, unlike some cell fate decisions in mammalian haematopoiesis.

Key words : Haematopoiesis, *Drosophila*, GATA, Serpent, FOG, U-Shaped, RUNX, Lozenge, Gcm, Gcm2, Cell fate choice.

Auteur : Laetitia BATAILLÉ

**Titre : Mécanismes de régulation de l'hématopoïèse embryonnaire
chez la Drosophile**

Soutenue le 30 Juin 2006

Salle de conférence, IBCG, 118 route de Narbonne, Toulouse

Directeurs de Thèse : Lucas WALTZER et Marc HAENLIN

Centre de Biologie du Développement. UMR5547 CNRS/UPS,

Bat 4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9

RESUME DES TRAVAUX

L'hématopoïèse regroupe les phénomènes menant à la formation des composantes cellulaires du sang. Au cours de ce processus, des cellules précurseurs vont proliférer et se différencier dans les multiples types cellulaires spécialisés. Le développement du système hématopoïétique de la Drosophile et des vertébrés présente de nombreuses similitudes aussi bien au niveau fonctionnel et ontogénique qu'au niveau des gènes qui régulent la formation des cellules sanguines. Chez la Drosophile, au stade embryonnaire, les précurseurs hématopoïétiques, les prohémostocytes, vont générer deux types de cellules sanguines, les plasmotocytes et les cellules à cristaux. Nous avons entrepris de caractériser les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse embryonnaire chez la Drosophile.

Dans un premier temps, nous avons analysé la fonction et le mode d'action du facteur de transcriptions de type GATA Serpent (Srp) au cours de ce processus. Nous avons mis en évidence que le gène *serpent* code pour deux isoformes qui ont des activités différentielles au cours de ce processus. D'autre part, nous avons montré que l'activité de Srp au cours de l'hématopoïèse est modulée par recrutement de cofacteurs. Ainsi, nous avons montré que Srp est capable de recruter U-Shaped, un cofacteur de type FOG (Friend Of GATA), mais aussi, de former un complexe fonctionnel avec le facteur de transcription de type RUNX, Lozenge. La caractérisation des isoformes de Srp et la mise en évidence de l'interaction de ce facteur GATA avec différents partenaires a permis de mettre en évidence la versatilité des fonctions de *srp* au cours de l'hématopoïèse.

Dans un second temps, nous avons entrepris de caractériser *in vivo* l'étape de ségrégation des deux populations, plasmotocytes et cellules à cristaux. Nous avons mis en évidence que la ségrégation de ces deux lignages à partir d'une population de prohémostocytes bipotents est un processus très dynamique, contrôlé par un mécanisme original en deux étapes. Cette régulation qui fait intervenir les facteurs de transcription lignage-spécifiques Lozenge et Glial-Cell-Missing (Gcm) et Gcm2, contrôle précocement la détermination des précurseurs et tardivement le maintien de l'identité de ces cellules dans les phases de différenciation en cellules à cristaux *versus* plasmotocytes. De manière intéressante, nous avons montré que la régulation de la ségrégation, ne repose pas sur un antagonisme réciproque entre les facteurs de transcription lignage-spécifiques. Ce mécanisme qui contrôle l'acquisition d'un destin cellulaire diffère donc des processus de régulation de l'hématopoïèse mis en évidence chez les mammifères.

Mots clés : hématopoïèse, Drosophile, facteur GATA, Serpent, facteur FOG, U-Shaped, facteur RUNX, Lozenge, Gcm, Gcm2, ségrégation, lignage.