

La voie des récepteurs Torso et Sevenless chez la drosophile

Un modèle pour l'étude de la signalisation cellulaire par les récepteurs tyrosine kinase

Claudie Lamour-Isnard
Ruth Griffin-Shea

Chez la drosophile, des stratégies génétiques très efficaces ont été mises au point pour étudier la transmission du signal par les récepteurs tyrosine kinase Torso et Sevenless. Ceux-ci sont impliqués respectivement dans la formation des régions terminales de l'embryon, et dans celle de la cellule photoréceptrice R7. Les composants de ces voies de transmission du signal ont été identifiés et ordonnés depuis la réception de ce signal jusqu'à la réponse nucléaire. Le signal transmis par les RTK de drosophile emprunte la voie des MAP-kinases, très conservée dans le monde animal. D'autres intervenants récemment caractérisés modulent la transmission du signal et contribuent à la spécificité cellulaire.

ADRESSES

C. Lamour-Isnard : *professeur à l'Université Paris VII-Denis-Diderot*. Laboratoire de génétique du développement et évolution, Institut Jacques-Monod, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France. R. Griffin-Shea : *chargée de recherche au Cnrs*. UMR 314 CEA/Cnrs, département de biologie moléculaire et biophysique des systèmes intégrés, CEA/Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

Depuis quelques années, les études concernant la transmission du signal cellulaire par les récepteurs membranaires possédant un domaine cytoplasmique à fonction tyrosine kinase (RTK), réalisées en parallèle chez les vertébrés et les invertébrés, ont convergé pour révéler, d'une part, la grande diversité des processus biologiques contrôlés

par les RTK et, d'autre part, l'étonnante conservation de ces mécanismes au cours de l'évolution. Les approches mises en œuvre chez les deux types d'organismes sont très différentes. Tandis que chez les vertébrés, c'est l'approche biochimique appliquée à des cellules en culture qui fait l'objet de la majorité des travaux, chez les invertébrés, nématode et drosophile, les études concernent

les organismes entiers et l'outil génétique a, bien sûr, été largement utilisé. L'objet de cet article est de décrire les stratégies génétiques mises en œuvre chez la drosophile pour analyser la transmission du signal par les RTK, et de montrer comment ces études, utilisant les connaissances acquises chez les vertébrés, ont en retour permis de faire progresser ces dernières. De cette coopération a résulté une avancée spectaculaire de la connaissance des mécanismes de signalisation par ces récepteurs.

Chez la drosophile, nos connaissances actuelles proviennent principalement des travaux effectués sur deux RTK: Torso (Tor) et Sevenless (Sev), respectivement impliquées dans la détermination des parties terminales de l'embryon, et dans la spécification d'un type particulier de cellule photoréceptrice de l'œil, la cellule R7. Différents éléments expliquent le succès de ces deux systèmes. En premier lieu, l'embryon et l'œil de la drosophile ont été étudiés de façon extensive depuis une quinzaine d'années, car ils constituent des modèles de choix pour l'étude du développement et de la morphogenèse [1, 2]. Ces études ont conduit à l'isolement de nombreux mutants, dont certains affectent les récepteurs Torso ou Sevenless eux-mêmes, ou leurs partenaires. La caractérisation et l'étude de ces mutants ont été favorisées par le fait que, contrairement à d'autres récepteurs, Sevenless et Torso possèdent un rôle unique au cours du développement de la drosophile. Une autre RTK de drosophile a également fait l'objet de nombreux travaux: il s'agit de la protéine DER, pour *Drosophila EGF receptor*. Cette dernière, contrairement à Sevenless et Torso, est impliquée dans de très nombreux processus au cours du développement de la drosophile, et ses mutants présentent de ce fait un phénotype complexe, très variable selon les allèles. Cependant, les données concernant la voie de transmission du signal de DER indiquent qu'elle met vraisemblablement en œuvre les mêmes intermédiaires que les voies de Sevenless et de Torso.

Ces observations posent évidemment un problème très général: comment des récepteurs différents, mais qui activent la même voie de transmis-

sion du signal, peuvent-ils induire des réponses cellulaires différentes? La réponse à cette question, fondamentale pour la compréhension de la transmission intracellulaire du signal, est loin d'être claire, mais différentes hypothèses peuvent être proposées, qui seront discutées à la fin de cet article.

Torso et la spécification des extrémités de l'embryon

Chez la drosophile, la formation des extrémités de l'embryon dépend de l'expression, pendant l'ovogenèse, des gènes *torso* (*tor*), *trunk* (*trk*), *female sterile of Nasrat* (*fs(1)N*), *female sterile pole-hole* (*fs(1)ph*) et *torso-like* (*tsl*), qui constituent le groupe terminal des gènes maternels [1, 3]. L'information résultant de l'activité de ces gènes induit au début du développement embryonnaire l'expression aux

pôles des gènes *tailless* (*tll*) et *huckbein* (*hbk*) dont les produits sont des facteurs de transcription. Ces facteurs contrôleraient localement l'expression de gènes effecteurs, dont l'activité conduirait finalement à la formation des structures caractéristiques des extrémités de l'embryon.

Ce modèle est issu de l'observation que les embryons dont les mères sont mutantes pour l'un des cinq gènes maternels, ainsi que les embryons mutants pour *tll* et *hbk*, sont dépourvus de leurs extrémités antérieures et postérieures (figure 1). Ce phénotype, appelé *terminal*, est récessif (il ne s'observe que lorsque les deux exemplaires du gène sont mutés), et résulte donc vraisemblablement d'une perte de fonction du gène concerné. Cependant, un petit nombre de mutations trouvées dans le gène *torso*, appelées *tor^{GF}* (GF pour gain de fonction) provoquent le phénotype inverse, c'est-à-dire une exten-

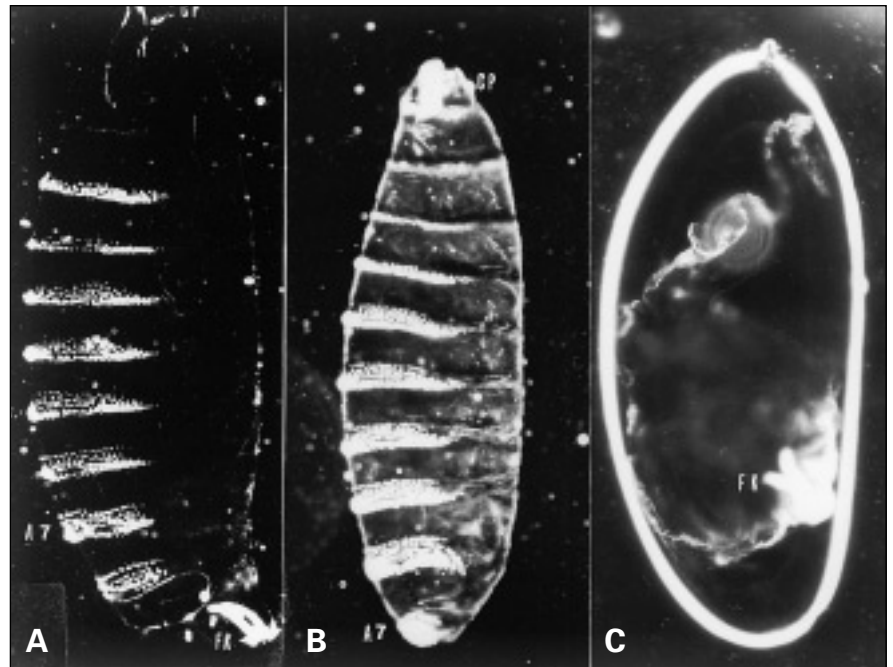


Figure 1. **Phénotype cuticulaire d'embryons de phénotypes sauvage et mutants pour torso.** A. Embryon sauvage. B. Embryon né d'une femelle homozygote *tor^{-/-}*. On observe une réduction du squelette céphalopharyngien (CP) et l'absence des régions embryonnaires postérieures au septième segment abdominal (A7) (phénotype terminal). C. Embryon né d'une femelle possédant un allèle *tor^{GF}*. Les régions terminales sont très développées (notez l'hypertrophie des extrémités des trachées (FK)), tandis que les régions segmentées centrales sont complètement absentes (phénotype spliced).

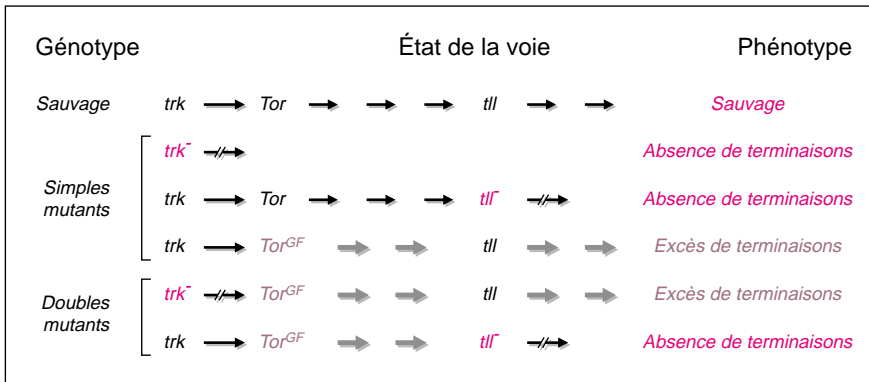


Figure 2. **Schéma illustrant les relations d'épistasie entre mutants conférant des phénotypes différents.** Ce schéma montre que, dans l'hypothèse d'une cascade génétique linéaire, le gène muté le plus en aval impose son phénotype au double mutant. L'allèle *Tor*^{GF} est un allèle gain de fonction. Les autres allèles correspondent à une perte de fonction des gènes concernés (signalée par l'exposant -). *trk*: *trunk*; *tll*: *tailless*.

sion des régions terminales des embryons (phénotype *Spliced*, figure 1C). Ce phénotype est dominant, ce qui indique que les allèles *tor*^{GF} codent pour un produit possédant une activité anormale, qui s'exprime même en présence de la fonction Torso normale [4]. L'existence de mutations conférant des phénotypes opposés permet, en les associant chez un double mutant, de déterminer l'ordre d'intervention des gènes concernés (figure 2). On a ainsi pu établir que l'activité de Torso se situait en aval de celle des quatre autres gènes maternels, mais en amont, comme on pouvait s'y attendre, de celle des gènes zygotiques *tll* et *hkb* [3, 4]. Par ailleurs, l'étude de femelles chimères, possédant des cellules germinales mutantes dans un contexte somatique sauvage (figure 3) a permis de montrer que quatre des gènes maternels (*tor*, *fs(1)N*, *fs(1)ph* et *trk*) devaient être exprimés dans les cellules germinales des follicules ovariens, et le cinquième, *tsl*, dans les cellules folliculaires d'origine somatique [3].

Le gène *torso* code pour une protéine transmembranaire possédant un domaine cytoplasmique de type tyrosine kinase, détectable jusqu'à la gastrulation, et uniformément répartie à la surface du jeune embryon [5, 6]. Les mutations ponctuelles de *tor* qui affectent les résidus du domaine catalytique conservés dans les kinases conduisent à une perte de sa fonction, ce qui montre que l'intégrité du domaine tyrosine kinase est cru-

ciale pour l'activité de Torso. Les mutations entraînant au contraire un gain de fonction du gène sont toutes associées à des changements d'acides aminés dans le domaine extracellulaire de la protéine [7]. La protéine Torso serait donc un récepteur membranaire localisé sur toute la surface de l'embryon, mais dont l'activation ne se produirait qu'aux pôles (figure 4). Les mutations *Tor*^{GF} entraîneraient une activation constitutive de la kinase, et l'apparition de structures terminales ubiquitaires.

Dans le cas des RTK de mammifères, la liaison du ligand provoque une dimérisation permettant la phosphorylation croisée de chacun des monomères sur un ou plusieurs résidus tyrosine, et l'activation de la kinase. La protéine Torso, au tout début du développement embryonnaire, présente effectivement un pic de phosphorylation sur une tyrosine, qui disparaît lorsqu'un autre gène maternel du groupe terminal est muté. Cette observation est en accord avec les résultats génétiques qui montrent que *torso* intervient en aval des autres gènes maternels. En revanche, chez les mutants possédant un allèle *tor*^{GF}, la protéine Torso est phosphorylée pendant toute la période où sa présence peut être décelée, ce qui est cohérent avec l'hypothèse que ces allèles codent pour une tyrosine kinase dont l'activité est constitutive [8]. Enfin, on a montré récemment que Torso s'autophosphorylait *in vitro* sur deux résidus tyrosine [9]. Le remplacement du premier (tyrosine 630) par

un autre acide aminé produit *in vivo* un phénotype terminal, tandis que le remplacement du second (tyrosine 918) produit un phénotype *Spliced*, similaire à celui induit par les allèles *tor*^{GF}. La phosphorylation de ces deux résidus aurait donc des effets inverses, l'une réglant positivement, et l'autre négativement l'activité de Torso.

Parmi les gènes dont l'activité est requise en amont de *torso*, c'est *trunk* qui paraît actuellement le meilleur candidat pour coder pour le ligand du récepteur Torso [10]. La protéine Trk possède en effet un peptide signal (elle pourrait donc être sécrétée), un site de clivage protéolytique et un domaine riche en cystéines caractéristique de plusieurs familles de ligands extracellulaires. Le profil d'expression du gène *trk* n'est pas encore connu, mais l'analyse génétique (voir ci-dessus) a montré qu'il devait être exprimé dans les cellules germinales de l'ovaire. La protéine Trk produite dans l'ovocyte, ou dans l'œuf immédiatement après la fécondation, pourrait donc être sécrétée dans le liquide périvitellin, où elle serait clivée par protéolyse pour donner naissance au ligand actif. Le mécanisme limitant ce processus aux régions terminales de l'embryon pourrait faire intervenir la protéine sécrétée Tsl. En effet, la production de Tsl est restreinte à deux groupes de cellules folliculaires situées aux pôles de l'ovocyte (figure 3A), et son expression ubiquitaire pendant l'ovogenèse a les mêmes effets que l'activation constitutive de Torso [11]. La protéine Tsl serait donc nécessaire à l'activation du ligand Trk; n'étant présente qu'aux pôles, elle limiterait l'activation de Torso à ces deux régions (figure 4).

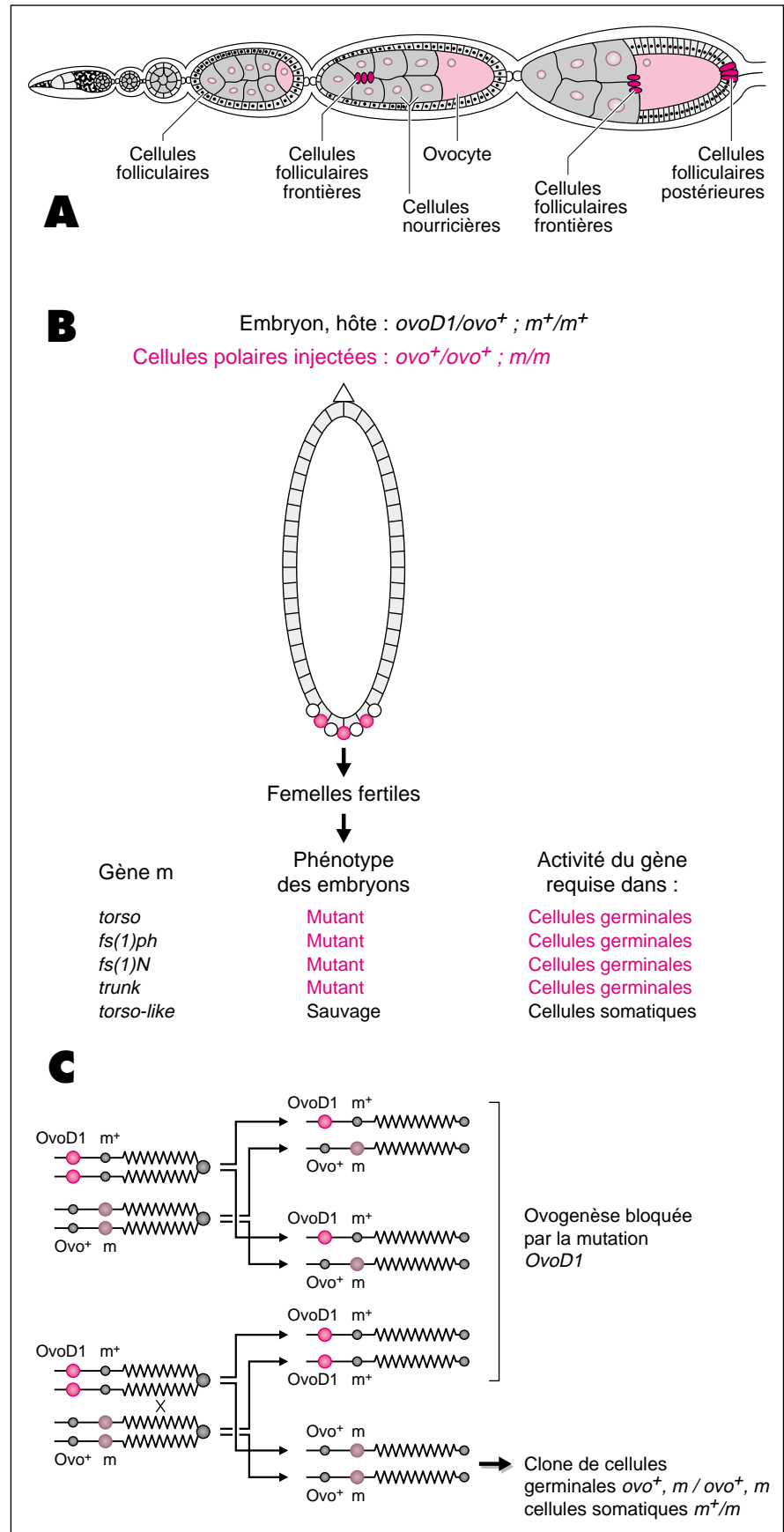
Sevenless et la spécification de la cellule photoréceptrice R7

L'œil composé de la drosophile est formé de 800 ommatidies, chacune constituée de 8 cellules photoréceptrices (R1 à R8), différant par leur morphologie, leur sensibilité spectrale et leur position, de 4 cellules cônes (qui sécrètent le cristallin) et de 8 cellules pigmentaires (figure 5) [2]. Ces différents types cellulaires ne sont pas déterminés par leur lignage,

mais par leur position dans l'ommatidie en formation. Cette spécification met en jeu des phénomènes d'induction par des cellules voisines déjà engagées dans leur différenciation [12, 13]. Au cours de la morphogénèse de l'œil, les cellules R8 apparaissent les premières, régulièrement espacées, au niveau d'un sillon qui parcourt le disque imaginal d'œil au cours du troisième stade larvaire. Autour de chaque cellule R8 sont successivement recrutées les cellules photoréceptrices R2 et R5, R3 et R4, R1 et R6, et finalement R7; peu après apparaissent les 4 cellules cônes et les cellules pigmentaires [2, 13].

Deux gènes ont été identifiés, *sevenless* (*sev*) et *bride of sevenless* (*boss*), dont la fonction n'est requise que pour la formation du photorécepteur R7. Le seul phénotype observable chez les mutants *sev* et *boss* est la transformation de R7 en cellule cône. L'étude d'yeux mosaïques contenant un clone de cellules homozygotes *sev*/*sev* (ou *boss*/*boss*) dans un contexte hétérozygote pour le gène concerné a montré que la spécification de la cellule R7 requiert l'expression du gène *sev* dans la cellule précurseur de R7 elle-même, mais celle du gène *boss* dans la cellule R8 de la même ommatidie [13, 14].

Le produit du gène *sev* est une protéine transmembranaire possédant un domaine cytoplasmique tyrosine kinase [15]. Cette protéine est présente dans la cellule précurseur de R7, mais aussi dans d'autres cellules de l'ommatidie (en particulier dans les précurseurs des photorécepteurs R3, R4, R1 et R6, et dans ceux des cellules cônes). Quant au gène *boss*, il n'est transcrit que dans la cellule R8, et code pour une protéine qui possède 7 domaines transmembranaires et un grand domaine extracellulaire [2]. Cette protéine, présente à la surface des cellules R8, serait le ligand du récepteur *Sevenless*. En effet, la mise en culture de cellules dont certaines expriment *Boss* et d'autres *Sevenless* provoque l'agrégation de ces deux types de cellules [14, 16]. Cet effet est corrélé à une augmentation de la quantité de phosphotyrosine dans les cellules exprimant *sevenless*. Lors de la différenciation des ommatidies, la proximité des précurseurs de R7 et R8 permettrait la liaison de *Boss* au domaine extracellu-



◀ Figure 3. **Obtention de femelles possédant des ovaires mosaïques. A. Schéma d'une ovariole**: chaque chambre à œuf contient un clone de 16 cellules d'origine germinale connectées par des ponts cytoplasmiques, dont l'une se différencie en ovocyte, et les 15 autres en cellules nourricières qui vont synthétiser des constituants du cytoplasme de l'ovocyte. Ce groupe de 16 cellules est entouré d'un épithélium formé de cellules d'origine mésodermique, les cellules folliculaires. Les deux goupes de cellules folliculaires situées aux pôles de l'ovocyte (en rouge sur le schéma) synthétisent spécifiquement la protéine Torso-like, dont dépend l'activation régionalisée de la RTK Torso. **B. Obtention d'ovaires mosaïques par injection de cellules polaires**. La mutation *OvoD1* est une mutation conférant un phénotype de stérilité femelle dominant. Les femelles *OvoD1/ovo⁺*, ne pondent pas d'œufs car le développement de leurs ovocytes est bloqué à un stade précoce de l'ovogenèse. Des cellules germinales (cellules polaires) prélevées chez des embryons *ovo⁺m/ovo⁺m*, mutants pour l'un des gènes du groupe terminal *m*, sont transplantées dans des embryons *OvoD1 m⁺/ovo⁺m⁺*, sauvages pour le gène considéré. Certaines des femelles issues de ces embryons sont fertiles, et les embryons qu'elles engendrent proviennent obligatoirement d'ovocytes issus des cellules germinales injectées, de génotype *ovo⁺/ovo⁺*; *m/m*, dont l'ovogenèse s'est déroulée dans un contexte somatique *m⁺/m⁺*. Ces embryons développent un phénotype mutant de type terminal, si l'activité du gène *m⁺* n'est requise que dans les cellules germinales. Ils sont de phénotype sauvage si l'activité du gène *m⁺* n'est requise que dans les cellules somatiques de l'ovaire. **C. Obtention d'ovaires mosaïques par crossing-over mitotique**. Des larves de génotype *ovoD1 m⁺/ovo⁺ m* sont irradiées par des rayons X. Certaines femelles issues de ces larves sont fertiles: les embryons auxquels elles donnent naissance proviennent de cellules germinales *ovo⁺ m/ovo⁺ m* issues d'un crossing-over mitotique, induit par les rayons X, qui s'est produit entre le centromère et le locus *ovo*; les cellules somatiques de l'ovaire sont restées *m⁺/m*. Le phénotype des embryons obtenus pourra être mutant ou sauvage, selon que l'activité du gène *m* est requise dans les cellules germinales ou dans les cellules folliculaires. Cette méthode implique que le gène *ovoD1* et le gène *m* soient portés par le même chromosome. Le gène *ovo* est naturellement situé sur le chromosome X, mais on possède maintenant des lignées transgéniques portant un transgène *ovoD1* sur les chromosomes 2 et 3, ce qui permet d'utiliser cette méthode pour des gènes situés sur ces chromosomes.

laire de *Sevenless*, ce qui provoquerait l'activation de la kinase.

Cette activation induit bien *in vivo* une différenciation neuronale de type R7. En effet, les mouches possédant un gène *sev* codant pour une protéine tronquée dont l'activité kinase est constitutive présentent un excès de cellules R7 provenant de la transformation de cellules cônes [17]. La même transformation est observée lorsqu'on exprime un transgène *boss* dans toutes les cellules de l'œil [18]. Les précurseurs des cellules cônes sont donc fonctionnellement équivalents au précurseur de R7 mais, n'étant pas en contact avec la cellule R8, la RTK *Sev* qu'ils possèdent ne peut être activée dans les conditions normales (figure 5).

En revanche, comment expliquer que les cellules R3 et R4, R1 et R6, qui expriment le gène *sev*, et sont en contact avec R8, adoptent néanmoins une spécification différente de R7? On remarque que l'internalisation de *Boss* ne s'observe que dans R7, ce qui suggère que R1, R6, R3 et R4 seraient réfractaires à ce signal. Cependant, chez certains mutants affectés à un stade précoce de la formation des ommatidies, avant la spécification des photorécepteurs R3 et R4, on observe un excès de cellules R7, provenant vraisemblablement des précurseurs de R1 et R6, [18, 19]. Déroutés de leur voie de développe-

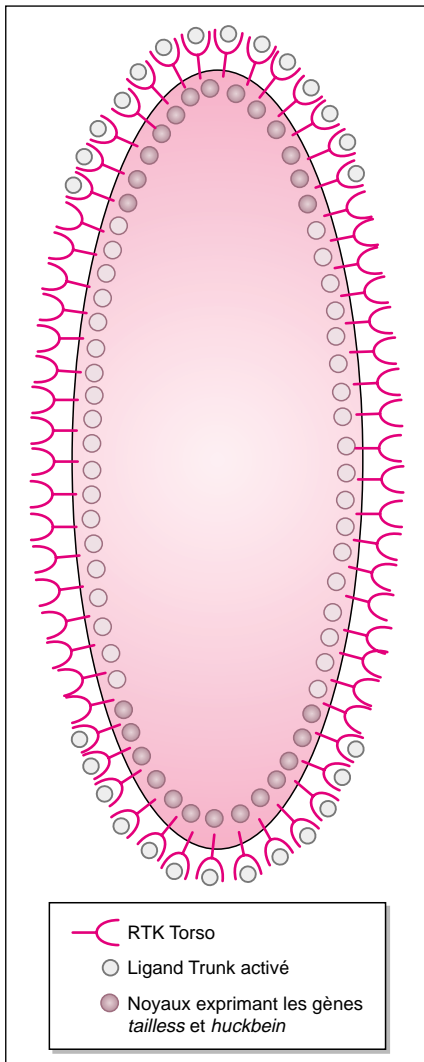
ment normale, ces photorécepteurs deviendraient donc réceptifs au signal *Boss*. Ce résultat met en évidence un élément important de l'établissement de l'identité cellulaire: il s'agit de l'histoire du développement des cellules, dont dépend leur capacité de réponse à des signaux spécifiques.

Identification des effecteurs de la voie: les stratégies génétiques

Les cribles génétiques fondés sur l'absence des terminaisons dans l'embryon, ou l'absence de cellule R7 dans l'œil, n'ont permis d'identifier aucun gène intervenant entre ces récepteurs et les facteurs de transcription impliqués dans la réponse à ces signaux. Cette observation suggérait que les effecteurs impliqués étaient requis dans d'autres voies de transmission du signal, et que leurs mutations devaient provoquer une létalité précoce, rendant impossible l'observation de leurs effets dans l'œil, ou dans la lignée germinale des femelles. Il fallait donc pour identifier ces gènes sélectionner des mutations interférant avec les voies de *Sevenless* et *Torso* dans des conditions où les fonctions affectées n'étaient pas totalement abolies chez les mutants.

Plusieurs stratégies répondant à cette exigence ont été utilisées (Tableau I). La première consiste à sélectionner

des mutations de type perte de fonction (X^- sur le Tableau I) qui, en condition hétérozygote (la quantité de produit actif étant alors diminuée par deux), permettent un développement normal de l'œil si elles sont associées à un allèle *sev* sauvage, mais induisent l'absence de cellules R7 chez des mouches possédant un allèle *sev* faiblement actif [19]. Ces mutations, qui aggravent sur un mode dominant le phénotype d'un allèle mutant de *sev*, ont été appelées *Enhancer of sev* (*E (sev)*). Des mutations similaires entraînent, toujours à l'état hétérozygote, une atténuation du phénotype «excès de terminaisons» dû à un allèle de *torso* actif de façon constitutive [20]. Ces mutations ont été appelées *Suppressor of tor* (*Su(Tor)*). Comme on pouvait s'y attendre, les mutations isolées avec ces deux types de cribles entraînent à l'état homozygote une létalité embryonnaire ou larvaire. On peut, cependant, par l'une des méthodes décrites sur la figure 3, obtenir des femelles viables dont la lignée germinale est mutante pour l'un de ces gènes: dans la plupart des cas, les embryons auxquels elles donnent naissance présentent un phénotype *terminal*. De même, des clones de cellules homozygotes induits dans l'œil de femelles hétérozygotes sont dépourvus de photorécepteurs R7. Ces gènes apparaissent donc bien directement impliqués à la



◀ Figure 4. **Schéma expliquant le contrôle de l'expression localisée des gènes *tailless* et *huckbein* dans l'embryon de drosophile.** Le récepteur-tyrosine kinase Torso est localisé sur toute la surface de l'embryon au stade de blastoderme syncytial. Son ligand (très vraisemblablement la protéine Trunk), sécrété par les cellules nourricières dans le liquide périvitellin, ne serait activé qu'au niveau des extrémités de l'embryon par un effecteur produit par les cellules folliculaires situées aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte (voir figure 3). L'activation de Torso par son ligand induirait la transmission d'un signal intracellulaire empruntant la voie des MAP-kinases, conduisant à la transcription des gènes *tailless* et *huckbein* dans les noyaux recevant ce signal. Les facteurs de transcription codés par ces gènes contrôleraient localement l'expression de gènes effecteurs dont l'activité conduirait à la formation de structures caractéristiques des extrémités de l'embryon.

fois dans la voie de Torso et dans celle de Sevenless.

Une troisième stratégie (Tableau I) consiste à rechercher des mutations dominantes supprimant les effets d'allèles abolissant la fonction d'un gène de la voie. Ces mutations rétablissent la cascade d'activations interrompue par la première mutation, et correspondent le plus souvent à des allèles codant pour une protéine dont l'activité est constitutive. Ces allèles confèrent en outre des phénotypes mimant, dans l'embryon, l'activation constitutive de Torso (phénotype *spliced*) et, dans l'œil, l'activation constitutive de Sevenless (excès de cellules R7).

La voie des MAP-kinases

Ces différents cribles génétiques ont conduit à l'identification de gènes

dont les produits sont connus chez les vertébrés pour participer à l'activation par les RTK de la voie des MAP-kinases (Tableau II). Les études réalisées chez la drosophile ont permis de préciser l'ordre de ces composants, et d'identifier de nouveaux partenaires.

Dans les cellules de mammifères, la première étape de la transduction du signal relayée par les RTK conduit à l'activation de Ras, une petite protéine G dont l'activité est réglée par les nucléotides à guanine [21]. La liaison entre le récepteur et Ras met en jeu une protéine adaptatrice de type SH3-SH2-SH3, appelée Grb2, qui s'associe par son domaine SH2 (*Src homology 2*) à une phosphotyrosine du récepteur activé [21]. Chez la drosophile ont été identifiés les gènes *Ras1* et *drk* (*down of receptor kinase*), dont les produits sont respec-

tivement homologues de H-Ras et Grb2, ainsi qu'un troisième gène, *son of sevenless* (*Sos*), qui code pour une nouvelle protéine capable de former *in vitro* et *in vivo* un complexe avec Drk (Tableau II) [14, 19, 22]. La protéine Sos contient un domaine présent dans la protéine CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae* qui catalyse chez cette dernière l'activation de Ras en stimulant le remplacement du GDP lié à Ras par du GTP libre. L'auto-phosphorylation du récepteur sur une tyrosine permettrait donc à ce dernier de s'associer avec le domaine SH2 de Drk, dont l'un des domaines SH3 s'associerait à Sos. Cette interaction rapprocherait Sos de la membrane, le plaçant à proximité de Ras1 qu'il pourrait activer. Le fait que l'expression dans le disque d'œil d'une protéine Ras1 activée de manière constitutive abolisse l'effet de la perte de fonction de *drk*, en permettant la formation de cellules R7, confirme que Ras1 intervient bien en aval de Drk. Les homologues humains et murins de *Sos* ont été isolés à partir du gène de drosophile, et leur rôle dans l'activation de Ras a pu être démontré par un test biochimique direct [21].

Un autre gène règle, négativement cette fois, l'activité Ras1. Il s'agit de *Gap1*, dont le produit possède un domaine Ras-GTPase similaire à celui de la protéine p120 GAP de mammifère, qui favorise l'hydrolyse du GTP lié à Ras [23]. Les mutations correspondant à une perte de fonction de *Gap1* ont l'effet inverse de celles affectant *drk*, *Ras1* ou *Sos*, car elles corrigent, à l'état hétérozygote, le phénotype provoqué par une diminution d'activité de *sevenless* (Tableau II). A l'état homozygote, ces mutations n'entraînent pas de létalité, mais confèrent aux adultes différents défauts, parmi lesquels un phénotype d'œil rugueux dû à un excès de cellules R7. La protéine Gap1 paraît donc bien impliquée dans le contrôle négatif de la voie Sev, mais on ignore jusqu'à présent si son activité est réglée par Sevenless.

L'un des effecteurs directs de Ras chez les mammifères est la sérine-thréonine kinase Raf, qui possède un domaine de liaison à Ras. En culture de cellules, Raf est activée par oligodimérisation en réponse à l'activa-

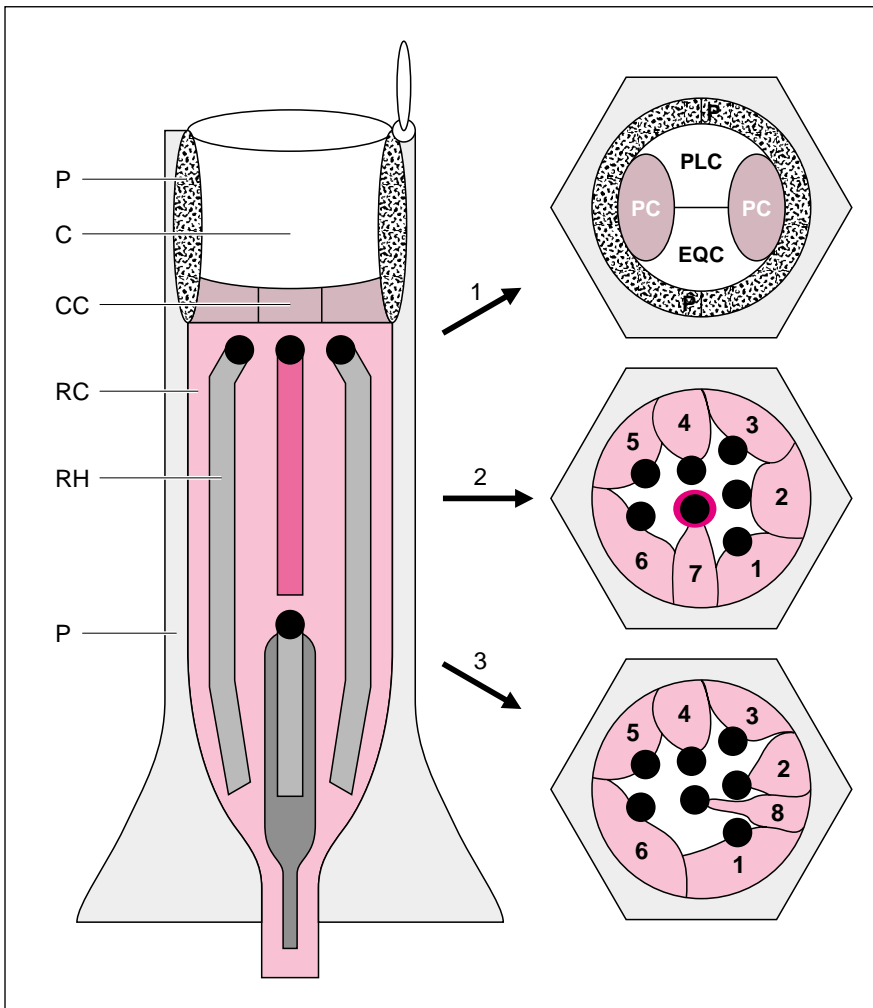


Figure 5. **Schéma d'une ommatidie.** Représentations schématiques d'une coupe longitudinale (à gauche) et de coupes transversales (à droite) d'une ommatidie. P: cellules pigmentaires. CC: cellules cônes (PLC, EQC, PC, AC). RC: cellules photoréceptrices (corps cellulaires). RH: rhabdomères. C: cristallin. Le corps cellulaire de la cellule R8, qui occupe le centre de l'ommatidie, est en contact avec les cellules photoréceptrices R1 à R6 qui l'entourent, ainsi qu'avec la cellule R7 située au-dessus d'elle.

tion de Ras [21, 24]. Chez la drosophile, le gène *D-raf* a été isolé en criblant une banque d'ADN génomique avec un fragment de l'oncogène *RAF* humain. La perte de fonction du gène provoque une létalité larvaire, et confère bien, en clones germinaux, un phénotype terminal, et, dans l'œil, l'absence des cellules R7 [25, 26]. Dans la voie Sevenless comme dans la voie Torso, D-Raf agit en aval de Ras1, car les effets de l'expression d'une protéine Ras1 constitutive dans l'embryon – expansion des régions terminales –, et dans l'œil – excès de cellules R7 – sont corrigés par une diminution de l'acti-

tivité D-Raf. En outre, les formes modifiées de Raf qui sont attachées à la membrane ont une activité constitutive. C'est le cas chez la drosophile pour la protéine codée par le transgène *raf^{tor}* qui induit, lorsqu'il est exprimé dans l'œil, un excès de cellules R7 (Tableau II). Le rôle de Ras1, en réponse à l'activation du récepteur, serait donc de localiser D-Raf près de la membrane, où la sérine-thréonine kinase serait activée. En aval de D-Raf interviennent successivement, dans la voie de Torso comme dans celle de Sevenless, les kinases D-Mek (encore appelée, à cause du crible qui a permis de

l'identifier, *D-suppressor of raf* (D-Sor1)) et Rolled (Rl), homologues respectivement des kinases MEK (pour MAPK/ERK-kinase) et MAPK (*mitogen activated protein-kinase*) de mammifères (Tableau II) [27-29]. Chez les mammifères, la sérine-thréonine kinase Raf forme un complexe avec MEK, qu'elle phosphoryle. Cette dernière, phosphoryle à son tour, sur une tyrosine et une thréonine, la MAPK qui est alors transloquée dans le noyau, où elle va régler par phosphorylation l'activité de facteurs de transcription [21]. Des allèles de type perte-de-fonction, et gain-de-fonction existant pour les gènes *D-raf*, *D-Mek* et *rl* (Tableau II), l'ordre d'intervention des trois kinases dans les voies de Sevenless et Torso a pu être déterminé (figure 2). L'ordre obtenu (D-Raf-D-MEK-Rolled), ainsi que le très fort degré d'identité entre D-MEK et la protéine murine MEK1, d'une part (66 % d'identité), entre Rolled et la MAP-kinase ERK1 de rat, d'autre part (80 % d'identité), rendent très probable que la même cascade intervienne chez la drosophile. La MAPK Rolled constituerait donc le lien entre la transduction cytoplasmique des signaux par les récepteurs Sevenless et Torso, et le noyau des cellules recevant ces signaux (figure 6).

Une autre voie en aval du récepteur ?

Plusieurs observations suggèrent que la voie de transmission du signal qui vient d'être décrite n'est pas la seule à être activée en réponse à la stimulation des RTK Torso et Sevenless. En effet, les embryons totalement dépourvus d'activité maternelle Ras1, Drk ou Sos conservent davantage de structures terminales que les embryons dépourvus d'activité D-Raf ou Tor, ce qui montre que la transduction du signal émis par Torso est diminuée, mais non abolie, en absence de Ras1 ou de ses partenaires Drk et Sos [30]. En outre, un allèle de *D-raf* muté dans le domaine de liaison à Ras1, et dont le produit ne forme plus de complexe avec Ras1, ne confère pas de phénotype terminal, ce qui montre que la protéine D-Raf codée par cet allèle reste capable de transduire le signal reçu par Torso. De même, un allèle de *sev* codant pour une protéine ne for-

Tableau I

**STRATÉGIES GÉNÉTIQUES UTILISÉES POUR L'IDENTIFICATION
DES GÈNES CODANT LES EFFECTEURS DES VOIES DE SIGNALISATION
SEVENLESS ET TORSO**

Stratégie 1

<i>sev⁺/sev⁺</i>	<i>X⁺/X⁺</i>	100 % d'ommatidies avec R7
<i>sev⁺/sev⁻</i>	<i>X⁺/X⁻</i>	100 % d'ommatidies avec R7
<i>sev^{B4}/sev^{B4}</i> ⁽¹⁾	<i>X⁺/X⁺</i>	> 90 % d'ommatidies avec R7
<i>sev^{B4}/sev^{B4}</i>	<i>X⁺/X⁻</i> ⁽²⁾	< 10 % d'ommatidies avec R7

affaiblissement du signal Sev : X⁻ = E(sev)

Stratégie 2

<i>tor⁺/tor⁺</i>	<i>X⁺/X⁺</i>	embryon sauvage
<i>tor⁺/tor⁻</i>	<i>X⁺/X⁻</i>	embryon sauvage
<i>Tor^{GF}/tor⁺</i>	<i>X⁺/X⁺</i>	embryon « Spliced »
<i>Tor^{GF}/tor⁻</i>	<i>X⁺/X⁻</i> ⁽²⁾	embryon sauvage (+/-)

affaiblissement du signal Tor constitutif : X⁻ = Su(tor)

Stratégie 3

<i>boss⁺/boss⁺</i>	<i>X⁺/X⁺</i>	présence de cellule R7
<i>boss⁺/boss⁻</i>	<i>X⁺/X⁺</i>	absence de cellules R7
<i>boss⁻/boss⁻</i>	<i>X⁺/X[*]</i> ⁽³⁾	présence de cellule R7

rétablissement de la cascade d'activations : X^{*} = Su (boss)

⁽¹⁾ L'allèle *sev^{B4}* confère un phénotype thermosensible; les mouches sont ici élevées à une température voisine, mais inférieure à la température restrictive. À cette température, la tyrosine kinase *Sevenless* codée par cet allèle possède une activité juste suffisante pour la transmission du signal, et plus de 90% des ommatidies possèdent une cellule R7.

⁽²⁾ Dans les stratégies 1 et 2, X⁻ représente une mutation perte de fonction d'un gène codant pour un effecteur X de la voie de transmission du signal. Dans la stratégie 1, X⁻ est sélectionnée comme enhancer dominant du phénotype conféré par l'allèle *sev^{B4}* (E(sev)), car elle aggrave le phénotype « absence de cellule R7 » qu'il induit. Dans la stratégie 2, X⁻ est sélectionnée comme suppresseur dominant du phénotype induit par l'allèle *tor^{GF}* (Su(tor)), car elle diminue le phénotype Spliced dû à l'activité constitutive du récepteur *Tor^{GF}*.

⁽³⁾ Dans la stratégie 3, X^{*} représente une mutation gain de fonction conférant une activité constitutive à l'effecteur X.

mant plus d'associations avec Drk reste capable, avec une efficacité faible, d'induire la différenciation de photorécepteurs R7 [31]. Une partie des signaux émis par Torso et *Sevenless* paraît donc transduite par une voie n'impliquant pas Drk, Sos et Ras1.

Cette autre voie pourrait faire intervenir la tyrosine-phosphatase *Corkscrew* (Csw), dont le gène a été identifié par des mutations *E(sev)* [19] (Tableau II), et qui est l'homologue de la tyrosine-phosphatase SH-PTP2/Syp capable, chez les vertébrés, de s'associer à des RTK activées. En absence d'activité Csw, l'activité signalisatrice de Torso, comme celle de *Sevenless*, est diminuée [32]. La

phosphatase Csw possède un domaine SH2, et se lie *in vitro*, vraisemblablement par ce domaine, à la phosphotyrosine 630 de Torso, impliquée comme nous l'avons vu plus haut dans l'activation de la RTK [9]. Csw serait également capable de se lier à Sev *in vivo* [33]. Les relations d'épistasie* de *csw* et *Ras1* ne permettent pas d'ordonner ces gènes dans une voie linéaire, ce qui suggère que ces composants interviendraient dans des voies différentes [33].

Il faut noter que Torso, contrairement à *Sevenless*, ne forme pas, *in vitro*, d'association avec Drk [9].

* Interaction entre deux gènes non alléliques dont l'un empêche l'autre de s'exprimer (voir figure 2).

Cette observation est en accord avec le fait que Torso ne possède pas de séquence de liaison consensus à Grb2. En revanche, Csw possède une telle séquence consensus, et il est possible que, *in vivo*, l'association entre Torso et Drk se fasse *via* Csw, qui interviendrait dans ce cas également dans la voie menant à Ras1 [33].

L'une des cibles de la phosphatase Csw vient d'être identifiée [34, 35] (Tableau II). Il s'agit d'une protéine possédant un domaine PH (*pleckstrin homology*) qui serait impliqué dans l'association à la membrane, un motif polyproline susceptible de se lier à un domaine SH3, ainsi que plusieurs sites de phosphorylation sur tyrosine présentant un consensus de liaison à un domaine SH2. Cette protéine, appelés *daughter of sevenless* (Dos), possède donc les caractéristiques des protéines de transmission du signal dites « multiadaptatrices », comme IRS-1, IRS-2 ou Gab-1, dont le rôle serait de relier des RTK activées à d'autres molécules de transmission du signal contenant des domaines SH2 et SH3. Les activités de *csw* et *dos*, mais aussi de *drk*, sont nécessaires à la transmission du signal par un récepteur Sev qui ne forme plus d'associations avec Drk (voir ci-dessus) [34]. Cette observation montre que ces trois effecteurs participent à une voie parallèle de la voie commençant par l'association du récepteur Sev à Drk. Quant à la protéine Drk, elle interviendrait donc à plusieurs étapes de la transduction du signal.

Le modèle suivant se dégage de ces différentes observations: l'activation du récepteur permettrait la fixation de Csw sur une tyrosine phosphorylée du récepteur activé, ce qui provoquerait l'activation de la phosphatase. La déphosphorylation de Dos par Csw permettrait alors la formation d'un complexe multiprotéique impliquant Dos et d'autres molécules non encore identifiées. Ce complexe participerait, directement ou indirectement, à l'activation de D-Raf (figure 6).

De nouveaux partenaires en aval de Ras1

Bien qu'un certain nombre d'étapes reliant les RTK aux MAP-kinases

Tableau II

IDENTIFICATION DES GÈNES CODANT POUR DES EFFECTEURS DES VOIES TORSO ET SEVENLESS

Gène		Obtention d'allèles mutés		Fonction
		Perte de fonction	Constitutifs	
1 de la RTK à D-Raf	<i>drk</i>	E(<i>sev</i>) ⁽¹⁾	–	SH3-SH2-SH3
	<i>Sos</i>	E(<i>sev</i>) et Su (<i>Tor</i> ^{GF}) ⁽²⁾	–	GMRP
	<i>Ras1</i>	E(<i>sev</i>) et Su (<i>Tor</i> ^{GF})	<i>Ras</i> ^{v12} (3)	RAS
	<i>Gap1</i>	Su(<i>sev</i>)	–	Ras-GTPases
	<i>csw</i>	E(<i>sev</i>)	<i>Csw</i> ^{src90} (4)	Tyrosine-phosphatase
	<i>dos</i>	Su(<i>sev</i> ^{s11}) ⁽⁵⁾	–	protéine adaptatrice
2 Régulation de D-Raf	<i>ksr</i>	Su(<i>Ras</i> ^{v12})	–	S/T kinase
	<i>pp2A</i>	E(<i>Ras</i> ^{v12})	–	S/T phosphatase
	<i>D-Raf</i>	léthalité larvaire	<i>Raf</i> ^{for} (6)	S/T kinase Raf
3 Cascade MAPK	<i>D-Sor1</i>	–	Su(<i>Raf</i>)	MAPKK (MEK)
	<i>rl</i>	Su(<i>Raf</i> ^{for})	Su(<i>boss</i>)	MAPK

⁽¹⁾ E : mutation de type Enhancer, aggravant le phénotype mutant (voir Tableau I).

⁽²⁾ Su : mutation de type Suppresseur, corrigeant le phénotype mutant (voir Tableau I).

⁽³⁾ Introduction dans le gène *Ras1* d'une mutation ponctuelle présente dans une forme oncogénique de gène de mammifère.

⁽⁴⁾ Fusion entre le domaine d'association à la membrane du gène *Src-1* de drosophile et le gène *csw*.

⁽⁵⁾ *sevS11* code pour une protéine tronquée, dont l'activité est constitutive.

⁽⁶⁾ Fusion entre le domaine transmembranaire du gène *tor* et le gène *D-Raf* : la protéine chimère obtenue est associée à la membrane et constitutive-ment active.

Les allèles indiqués avec un exposant – correspondent à une perte de fonction du gène.

GMRP : guanine nucleotide release protein, facteur d'échange ; S/T : sérine, thréonine.

soient maintenant bien établies, il reste encore de nombreux points d'ombre comme, par exemple, le mode d'activation de la kinase Raf. Récemment, l'équipe de Rubin en Californie a recherché sur une grande échelle de nouveaux gènes contrôlant la voie Sevenless en aval de *Ras1*. Le crible utilisé consiste à rechercher des mutations diminuant (suppresseurs) ou aggravant (*enhancers*) l'excès de cellules R7 dû à l'expression dans l'œil d'un allèle codant pour une protéine *Ras1* constitutive (Tableau II). Parmi les locus suppresseurs identifiés, on trouve *D-Raf*, *D-Mek* et *rolled*, mais aussi de nouveaux gènes, qui n'avaient pas été identifiés dans les cribles précédents. L'un d'entre eux, *ksr* (*kinase suppressor of ras*), a pour produit une nouvelle kinase, qui, bien que présentant des ressemblances avec Raf, n'appartient pas à cette famille de protéines [36]. *Ksr* constitue certainement un élément très conservé de la voie des RTK, car on l'a retrouvée, à partir du gène de drosophile, chez la souris et chez l'homme. Elle existe également chez le nématode, où ses mutations sup-

priment le phénotype provoqué par une protéine *Ras* activée de manière constitutive. Les relations d'épistasie entre les gènes *ksr* et, respectivement, *Ras1* et *D-raf* montrent que *Ksr* agit entre *Ras1* et *D-Raf*, ce qui suggère que cette sérine-thréonine kinase pourrait intervenir dans la mystérieuse activation de Raf.

L'un des locus *enhancer* caractérisé code pour la sous-unité catalytique d'une sérine-thréonine phosphatase de type 2A, appelée PP2A [37]. Le fait qu'une diminution d'activité de ce gène augmente l'efficacité de la transmission du signal par *Ras1* montre que cette phosphatase règle négativement l'activité de *Ras1*. Curieusement, les mutations de ce gène ont l'effet inverse sur *D-Raf*, car elles diminuent au contraire l'excès de cellules R7 induit par une kinase *D-Raf* constitutive. PP2A réglerait donc la cascade *Ras1* à la fois positivement et négativement en déphosphorylant des facteurs intervenant à différentes étapes de cette cascade. L'analyse d'autres gènes est en cours, mais il est hors de doute que la caractérisation des 37 locus (18 suppresseurs et 19 *enhancers*) identifiés par

l'équipe de Rubin va apporter des données nouvelles sur la régulation de la voie des MAP-kinases.

Les cibles nucléaires

On possède maintenant un certain nombre d'informations sur la réponse nucléaire à la transmission du signal par Sevenless. La MAP-kinase Rolled modulerait directement l'activité de deux facteurs de transcription possédant un domaine ETS, *pointedP2* (*PntP2*) et *Yan*, présents dans les précurseurs de R7 et des cellules cônes, et dont l'un activerait et l'autre réprimerait le développement en cellule R7 [38]. Les mutations de ces gènes provoquent en effet, respectivement, la disparition et l'excès de photorécepteurs R7. En outre, en culture de cellules, la présence de protéines *Ras1* ou *Rolled* constitutivement actives stimule l'activité transcriptionnelle de *PntP2*, tandis qu'elle réprime celle de *Yan*. Le choix entre un destin de type « R7 » et un destin de type « cellule cône » résulterait donc de l'équilibre entre les activités *PntP2* et *Yan*. Dans les précurseurs des cellules cônes,

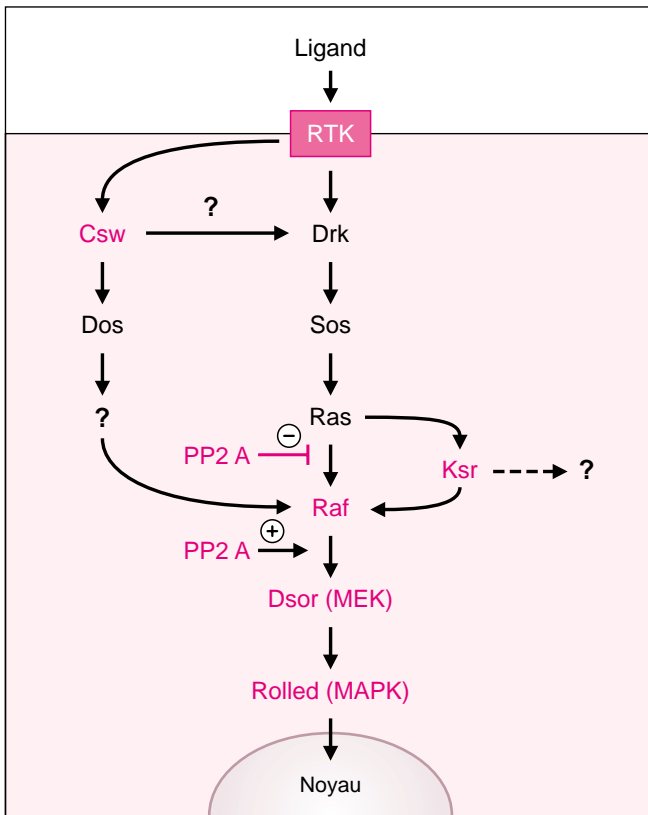


Figure 6. **La voie de transmission du signal des récepteurs tyrosine kinase (RTK) Torso et Sevenless chez la drosophile.** La liaison du ligand induit la dimérisation de ce dernier, et son auto-phosphorylation sur une tyrosine. Cela permet le recrutement de la protéine adaptatrice Drk (Down of tyrosine kinase) par association de son domaine SH2 avec une tyrosine phosphorylée du récepteur. Par l'un de ses domaines SH3, Drk recrute l'activateur de Ras

code pour un nouveau type de protéine nucléaire. Ce gène est exprimé dans R1, R6 et R7, mais pas dans les cellules cônes, et son activité est requise pour la formation de ces trois photorécepteurs [38]. La transcription du gène *phyllopod* est réglée positivement par la voie Sevenless, et négativement par Yan. L'analyse génétique confirme que la protéine Phyllopod intervient en aval de D-Jun dans le processus de formation de R7. D'autres facteurs sont impliqués dans ce processus, en parallèle ou en aval de Yan, D-Jun et PntP2. L'un d'entre eux est la protéine nucléaire Sina, dont l'activité n'est requise que dans R7 (le seul phénotype des mutants *sina* est l'absence de cette cellule dans les ommatidies), mais dont l'expression, indépendante de Sevenless, n'est pas suffisante pour induire la formation de cellule R7.

La réponse nucléaire à Torso est moins bien connue. Cette réponse inclut l'activation de la transcription du gène *tailless*. On a montré récemment que ce gène est en fait réprimé dans tout l'embryon par des facteurs ubiquitaires, et que la transmission du signal par Torso leverait cette répression aux pôles [41]. La protéine NTF-1 serait l'un des facteurs réprimant *tailless*. En effet, cette protéine se fixe sur un élément du promoteur de *tailless* dont on a montré qu'il était responsable de la répression de la transcription du gène. En outre, l'absence d'activité NTF-1 maternelle dans l'embryon induit une expansion du domaine d'expression de *tailless*. La protéine NTF-1 étant phosphorylée *in vitro* par les MAP-kinases, on suppose qu'*in vivo* sa phosphorylation par Rolled induirait son inactivation, ce qui permettrait la transcription de *tailless*. Il est clair cependant que NTF-1 ne rend pas compte de la totalité de la répression exercée sur *tailless*, et que d'autres facteurs, non encore identifiés, et dont l'activité doit également dépendre de Torso, sont impliqués dans la régulation de *tailless* et *huckbein*.

Spécificité de la réponse cellulaire

Bien que les récepteurs Torso et Sevenless soient très spécifiques d'un stade de développement et d'un type

Son of Sevenless (Sos), le rapprochant de la membrane, et de la protéine Ras1 qu'il peut alors activer. La protéine Ras1 forme alors une association avec la sérine-thréonine kinase D-Raf, ce qui permet son activation par un mécanisme encore inconnu. La kinase D-Raf activée phosphoryle la MAP-kinase-kinase D-MEK, qui va à son tour phosphoryler la MAP-kinase Rolled sur une thréonine et une tyrosine, ce qui provoque son transfert dans le noyau où elle va induire la réponse nucléaire au signal. Cependant, la transmission du signal émis par les RTK Torso et Sevenless est diminuée, mais non abolie en absence de Ras1 et de ses partenaires Drk et Sos. Une deuxième voie permet en effet l'activation de D-Raf en réponse à l'activation du récepteur. Cette voie fait intervenir la tyrosine-phosphatase Corkscrew (Csw), qui possède un domaine SH2 lui permettant de s'associer à une tyrosine phosphorylée du récepteur activé, et un substrat de cette phosphatase, la protéine multiadaptatrice Dos (Daughter of Sevenless). En outre, de nouveaux partenaires sont décrits en aval de Ras1, en particulier la sérine-thréonine phosphatase PP2A, qui règle à la fois positivement et négativement la cascade, et une nouvelle kinase, Ksr (Kinase suppressor of Ras), qui pourrait intervenir dans l'activation de D-Raf.

l'activité de Yan réprimerait la différenciation en cellule R7. Dans la cellule précurseur de R7, la MAP-kinase Rolled, transloquée dans le noyau, phosphorylerait Yan et PntP2, provoquant la dégradation du premier, et la stimulation de l'activité transcriptionnelle du second; ces deux effets permettraient la transcription de gènes spécifiques dont l'activité induirait la différenciation en cellule

R7 [39]. Le facteur de transcription D-Jun est également requis pour la spécification de R7, car une forme dominante négative de D-Jun induit l'absence de R7. D-Jun est phosphorylé par la MAP-kinase Rolled, et interagirait de façon coopérative avec PntP2 [40, 41].

L'un des gènes effecteurs réglés par ces facteurs de transcription a été identifié: il s'agit de *phyllopod*, qui

cellulaire donné, il est clair que les signaux qu'ils transmettent empruntent une voie très similaire, conservée dans l'ensemble du monde animal. Cette voie met en jeu la protéine adaptatrice Drk-Grb2, la protéine SOS activatrice de Ras, Ras1, les kinases D-Raf, D-Mek et la MAP-kinase Rolled. Un autre récepteur-tyrosine kinase, DER (*drosophila EGF-receptor*), connu pour intervenir dans de multiples processus au cours du développement de la drosophile fait vraisemblablement intervenir la même voie [19, 20, 43]. Quels sont donc les mécanismes qui assurent la spécificité de la réponse cellulaire après activation de récepteurs différents utilisant la même voie de transduction du signal ou, à partir d'un même récepteur, dans des cellules différentes à différents moments du développement ?

Même si certaines différences peuvent exister entre les récepteurs (par exemple Sevenless, contrairement à Torso, interagirait directement avec Drk), il ne semble pas que la nature du récepteur soit l'élément déterminant de la spécificité. En effet, un même récepteur, chez les vertébrés comme chez la drosophile (c'est le cas de DER), peut induire de multiples réponses différentes. Par ailleurs, on a pu, chez la drosophile, induire un excès de cellules R7 en exprimant dans l'œil, en absence de récepteur Sev fonctionnel, un récepteur Torso actif de façon constitutive [44]. Cette observation rend peu probable qu'une source importante de spécificité puisse résulter de l'activation par chaque récepteur d'une voie spécifique, parallèle à la voie Ras-MAPK commune. D'ailleurs, les cribles génétiques exhaustifs mis en œuvre pour identifier de nouveaux partenaires intervenant en aval du récepteur Sev n'ont jusqu'à présent mis en évidence que des composants cytoplasmiques intervenant également en aval de Torso et de DER. C'est le cas de Csw [19], de Dos [34, 35], et de Ksr [36].

Dans le cas des cellules PC12, le choix entre prolifération et différenciation neuronale dépend clairement du niveau et de la durée de l'activation de la MAP-kinase ERK [45]. Un rôle de la force du signal a également été mis en évidence dans la réponse à l'activation de Torso. En effet, des

mutations n'abolissant que partiellement la fonction du récepteur empêchent la formation aux pôles des structures tout à fait terminales de l'embryon, mais y autorisent la formation de structures normalement plus centrales, qui disparaissent en cas de perte totale d'activité de Torso. Les cellules des régions terminales ne sont donc pas prédéterminées à donner un type de réponse défini, mais répondent, au contraire, en fonction de la force du signal qu'elles reçoivent. De même, on sait qu'il existe dans l'épiderme ventral de l'embryon un gradient d'activité du récepteur DER, et que des réponses différentes sont induites par des niveaux d'activité différents [46]. Il n'en reste pas moins que l'expression d'une forme constitutive de la MAP-kinase Rolled mime, chez l'embryon l'expression constitutive de Torso, dans l'œil celle de Sevenless et dans l'aile celle de DER [29]. Cette observation montre que les modifications des réponses cellulaires obtenues en jouant sur la force du signal restent ici modérées, et qu'elles ne changent pas radicalement la nature de la réponse. Il est donc probable qu'une grande part de la spécificité de cette réponse réside en aval de la MAP-kinase, c'est-à-dire dans le noyau.

La transduction du signal conduit en effet à l'activation ou à la répression par la MAP-kinase de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes spécifiques. La connaissance de ces facteurs est encore incomplète, mais il est clair qu'aucun de ceux qui ont été identifiés dans la réponse à Sevenless (la mieux étudiée à ce jour) n'est spécifique de la différenciation de R7. Le facteur à domaine ETS PntP2, par exemple, est requis dans la spécification d'autres photorécepteurs, ainsi que dans celle des cellules gliales, deux processus qui dépendent de l'activation de DER; en revanche, PntP2 n'intervient pas dans la spécification des régions terminales de l'embryon. C'est donc très vraisemblablement la combinaison de facteurs de transcription présents dans la cellule au moment de l'induction qui va déterminer le type de réponse obtenue. La présence de ces facteurs constitue donc une prédétermination (*prepattern*), qui est le résultat

d'événements antérieurs intervenus dans la cellule elle-même, ou dans ses ascendants, et que l'activation de la voie de transmission du signal va révéler. Ce serait donc l'histoire de la cellule qui serait déterminante dans la nature de la réponse qu'elle va donner à un signal donné, même si d'autres éléments (force ou répétition du signal, différences subtiles entre les voies de transmission du signal des différents récepteurs, participation d'autres voies) peuvent intervenir pour moduler cette réponse ■

RÉFÉRENCES

1. St Johnston D, Nüsslein-Volhard C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1992; 68: 201-19.
2. Simon MA. Signal transduction during the development of the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Dev Biol* 1994; 166: 431-42.
3. Duffy JB, Perrimon N. The Torso pathway in *Drosophila*: lessons on receptor tyrosine kinase signalling and pattern formation. *Dev Biol* 1994; 166: 380-95.
4. Klinger M, Erdelyi M, Szabad J, Nüsslein-Volhard C. Function of *torso* in determining the terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* 1988; 335: 275-7.
5. Casanova J, Struhl G. Localized surface activity of *torso*, a receptor tyrosine kinase, specifies terminal body pattern in *Drosophila*. *Genes Dev* 1989; 3: 2025-38.
6. Sprenger F, Stevens LM, Nüsslein-Volhard C. The *Drosophila* gene *torso* encodes a putative receptor tyrosine kinase. *Nature* 1989; 338: 478-83.
7. Sprenger F, Nüsslein-Volhard C. Torso receptor activity is regulated by a diffusible ligand produced at the extracellular terminal regions of the *drosophila* egg. *Cell* 1992; 71: 987-1001.
8. Sprenger F, Trosclair MM, Morrison DK. Biochemical analysis of *torso* and D-raf during *Drosophila* embryogenesis: implications for terminal signal transduction. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1163-72.
9. Cleghon V, Gayko U, Copeland TD, Perkins LA, Perrimon N, Morrison DK. *Drosophila* terminal structure development is regulated by compensatory activities of positive and negative phosphotyrosine signaling sites on the Torso RTK. *Genes Dev* 1996; 10: 566-77.
10. Casanova J, Furriols M, McCormick CA, Struhl G. Similarities between trunk and spätzle, putative extracellular ligands specifying body pattern in *Drosophila*. *Genes Dev* 1995; 9: 2539-44.
11. Savant-Bhonsale S, Montell DJ. *torso-like* encodes the localized determinant of *Drosophila* terminal pattern formation. *Genes Dev* 1993; 7: 2548-55.

RÉFÉRENCES

12. Ready DF, Hanson TE, Benzer S. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* 1976; 53: 217-40.
13. Albagli O, Laget M, Chanut T. La morphogénèse myope de la rétine de drosophile. *Med Sci* 1997; 13: 175-83.
14. Albagli O, Laget M, Chanut T. Neurogénése et diversification de photorécepteurs de la drosophile. *Med Sci* 1997; 13: 184-91.
15. Hafen E, Basler K, Edstroem JE, Rubin GM. *Sevenless*, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science* 1987; 236: 55-63.
16. Kramer H, Cagan RL, Zipursky SL. Interaction of bride of sevenless membrane-bound ligand and the sevenless tyrosine-kinase receptor. *Nature* 1991; 352: 207-12.
17. Basler K, Christen B, Hafen E. Ligand-independent activation of the sevenless receptor tyrosine kinase changes the fate of cells in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 1991; 64: 1069-81.
18. Van Vactor DL, Cagan RL, Krâmer H, Zipursky SL. Induction in the developing compound eye of *Drosophila*: multiple mechanisms restrict R7 induction to a single retinal precursor cell. *Cell* 1991; 67: 1145-55.
19. Simon MA, Bowtell DD, Dodson GS, Laverty TR, Rubin GM. Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 1991; 67: 701-16.
20. Doyle SE, Bishop JM. Torso, a receptor tyrosine kinase required for embryonic pattern formation, shares substrates with the sevenless and EGF-R pathways in *Drosophila*. *Genes Dev* 1993; 7: 633-46.
21. Chardin P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *Med Sci* 1994; 10: 657-64.
22. Olivier JP, Raabe T, Henkemeyer M, Dickson B, Mbamalu G, Margolis B, Schlesinger J, Hafen E, Pawson T. A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the Sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange. *Cell* 1993; 73: 179-91.
23. Gaul U, Mardon G, Rubin GM. A putative Ras GTPase activating protein acts as a negative regulator of signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase. *Cell* 1992; 68: 1007-19.
24. Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 1996; 383: 181-5.
25. Ambrosio L, Mahowald AP, Perrimon N. Requirement of the *Drosophila raf* homologue for *torso* function. *Nature* 1989; 342: 288-91.
26. Dickson B, Sprenger F, Morrison D, Hafen E. Raf functions downstream of Ras1 in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* 1995; 360: 600-3.
27. Tsuda L, Inoue YH, Yoo MA, Mizuno M, Hata M, Lim YM, Achadi-Yamada T, Ryo H, Masamune Y, Nishida Y. A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the Raf kinase in *Drosophila*. *Cell* 1993; 72: 407-14.
28. Biggs WH, Zavitz KH, Dickson B, van der Straten A, Brunner D, Hafen E, Zipursky SL. The *Drosophila rolled* locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *EMBO J* 1994; 13: 1628-35.
29. Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, Zipursky SL, Hafen E. A gain-of-function MAP kinase in *Drosophila* activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Cell* 1994; 76: 865-88.
30. Hou XS, Chou TB, Melnick MB, Perrimon N. The Torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* 1995; 81: 63-71.
31. Raabe T, Olivier JP, Dickson B, Liu X, Gish GD, Pawson T, Hafen E. Biochemical and genetic analysis of the Drk SH2/SH3 adaptor protein of *Drosophila*. *EMBO J* 1995; 14: 2509-18.
32. Perkins LA, Larsen I, Perrimon N. *corkscrew* encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase Torso. *Cell* 1992; 70: 225-36.
33. Allard JD, Chang HC, Herbst R, McNeill H, Simon MA. The SH2-containing tyrosine phosphatase Corkscrew is required during signaling by Sevenless, Ras1 and Raf. *Development* 1996; 122: 1137-46.
34. Herbst R, Carroll PM, Allard JD, Schilling J, Raabe T, Simon MA. Daughter of Sevenless is a substrate of the phosphotyrosine Corkscrew and functions during Sevenless signaling. *Cell* 1996; 85: 899-909.
35. Raabe T, Riesgo-Escovar J, Liu X, Bausenwein BS, Deak P, Marôy P, Hafen E. DOS, a novel pleckstrin homology domain-containing protein required for signal transduction between Sevenless and Ras1 in *Drosophila*. *Cell* 1996; 85: 911-20.
36. Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, Rubin G. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* 1995; 83: 879-88.
37. Wassarman DA, Solomon NM, Chang HC, Karim FD, Therrien M, Rubin G. Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1-mediated photoreceptor development in *Drosophila*. *Genes Dev* 1996; 10: 272-8.
38. Dickson B. Nuclear factors in sevenless signalling. *Trends Genet* 1995; 11: 106-11.
39. Rebay L, Rubin G. Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* 1995; 81: 857-66.
40. Trier M, Bohmann D, Mlodzik M. Jun cooperates with the ETS domain protein Pointed to induce photoreceptor cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 1995; 83: 752-60.
41. Peverali FA, Isaksson AZ, Papavassiliou AG, Plastina P, Staszewski LM, Mlodzik M, Bohmann D. Phosphorylation of *Drosophila* Jun by MAP kinase rolled regulates photoreceptor differentiation. *EMBO J* 1996; 15: 3943-50.
42. Liaw GJ, Rudolph KM, Huang JD, Dubnicoff T, Courey AJ, Lengyel JA. The *torso* response element binds GAGA and NTF-1/Elf-1, and regulates *tailless* by relief of repression. *Genes Dev* 1995; 9: 3163-76.
43. Diaz-Benjumea FJ, Hafen E. The Sevenless signaling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development. *Development* 1994; 120: 569-78.
44. Dickson B, Sprenger F, Hafen E. Prepattern in the developing *Drosophila* eye revealed by an activated torso-sevenless chimeric receptor. *Genes Dev* 1992; 6: 2327-39.
45. Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A. Egf triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* 1994; 4: 694-701.
46. Golembo M, Schweitzer R, Freeman M, Ben-Zion S. *Argos* transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* 1996; 122: 223-30.

TIRÉS À PART

C. Lamour-Isnard.

Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule – Enseignement Pratique 9 mars-10 avril 1998

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard

Renseignements et Inscriptions, date limite le 1^{er} décembre 1997 – Mme Banisso

Secrétariat des Enseignements et des Stages – Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Tél. : 01 45 68 81 41 ou 01 40 61 33 62 – Fax : 01 40 61 30 46

Summary

The Torso and Sevenless pathways in *Drosophila*: a model system for cellular signalisation by tyrosine-kinase receptors

Comparative studies of signal transduction in vertebrates and invertebrates have revealed a universal intermediate signalling pathway between specific membrane tyrosine-kinase receptors (TKRs) and their downstream nuclear effectors. In *Drosophila*, powerful genetic techniques have enabled the identification and characterisation of the members of two TKR systems: the activation of the Torso receptor which triggers a cascade of kinase-related phosphorylations driving nuclear targets to direct specification of embryonic termini; and the Sevenless TKR which acts through the same intermediates to induce the differentiation of a specific photoreceptor cell (R7) in the eye ommatidium. Initially, mutant screens based on loss-of-function phenotypes (no embryonic ends, no R7 cell) succeeded in capturing those genes functioning only at the extremes of the signal chain – at the membrane (receptors, ligands and ligand-specific activators) and nuclear (transcription factors) levels. To isolate intermediate pathway members, common to multiple vital processes, screens were devised in which mutations altering the dosage of these gene products to sub-lethal levels nonetheless enhanced (enhancer mutations) or suppressed (suppressor mutations) phenotypes associated with mutated forms of Torso or Sevenless receptor partners. Once isolated, these loss-of-function and gain-of-function mutations are combined in the same animal to determine the order of gene functions. Furthermore, clones of homozygous mutant cells can be generated in heterozygous animals to pinpoint *in vivo* sites of action. Finally, the ability to introduce genes that have been mutagenised *in vitro* into fly embryos provides the ultimate test for hypotheses derived from genetic, biochemical and molecular biological analyses. Through these strategies, not only have the now-familiar Ras-MAPK intermediates been identified, but some 30-40 potentially new interacting genes have been defined, which reveal new aspects of these pathways, their fine regulation and the mechanisms providing the specificity of the cellular response.



6-7-8 Décembre 1997
(température de 6 à 21°C)
Méditerranée, France Israël Pêche

Organisé par l'ECOLE
Evolution et Accueil des connaissances médicales.

Organisé par l'AMMIZ (participation des Francophones et Israéliens)

201 1 01 48 81 85 80
(pour renseignements et participation voir site Web)

BIBLIOTHÈQUE

LES GROUPES SANGUINS

L'écriture des gènes

C. Salmon

Les groupes sanguins ne sont généralement connus du public que par leur aspect immunologique et leur application principale, la transfusion. Cet ouvrage prend le parti de présenter les groupes sanguins à partir des disciplines scientifiques qui en permettent l'approche, mettant l'accent sur la génétique et incluant les groupes sanguins dans les "empreintes génétiques" dont ils font partie. L'auteur explique comment les groupes sanguins relèvent aussi de la biochimie, de la biologie moléculaire moderne et de l'embryologie. Il décrit les applications des groupes sanguins en immunologie (transfusion, grossesses, greffes d'organes), en pathologie (autoimmunité) et en génétique aussi bien celle des individus (identité et paternité) que celle des populations humaines.



Éd. Masson,
1997, 208 pages, 250 F