

N° Ordre : 2669

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

par **Selim TERHZAZ**

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : NEUROSCIENCES ET NEUROPHARMACOLOGIE

Caractérisation de deux neuropeptides
chez *Drosophila melanogaster* :
la leucokinine et l'IFamide

Soutenue le 16 mai 2003

Devant la commission d'examen formée de :

Gerard TRAMU, Professeur Université Bordeaux I
Jean-Marc JALLON, Professeur Université Paris 11
Alain ROBICHON, Directeur de Recherche CNRS Dijon
Jochen LANG, Professeur Université Bordeaux I
Philippe ROSAY, Maître de Conférence Bordeaux I
Jan Adrianus VEENSTRA, Professeur Université Bordeaux I

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

-2003-

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à Monsieur le Professeur Veenstra pour m'avoir offert la possibilité d'effectuer la thèse sous sa direction dans le laboratoire de Neuroendocrinologie des Insectes de l'Université Bordeaux I. Il a suscité en moi un intérêt profond pour la recherche en me faisant partager sa passion et tout en m'encourageant à développer mes propres initiatives et ma curiosité scientifique. C'est grâce à sa rigueur scientifique, ses précieux conseils et à la grande liberté qu'il m'a accordé, que cette thèse a pu être menée à terme.

Je remercie Monsieur Rosay d'avoir suivi ce travail et de m'avoir fait partager ses nombreuses compétences et son aide dans la réalisation des expériences. Je le remercie également pour la disponibilité qu'il m'a accordé et les bons moments passés ensemble.

Je remercie Monsieur le Professeur Tramu d'avoir accepté d'être membre du jury de thèse et je lui exprime ma reconnaissance pour son écoute et ses précieux commentaires concernant mon manuscrit.

Je remercie Monsieur le Directeur de Recherche Robichon et Monsieur le Professeur Jallon d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Jochen LANG d'avoir accepté de faire partie de ce jury. C'est un grand honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail et de participer à la soutenance.

Je voudrais remercier Messieurs les Professeurs Jaffard et Discala ainsi que tous les membres du laboratoire des Neurosciences Cognitives de l'Université Bordeaux I et du CNRS qui nous ont accueilli et fait en sorte que la fin de cette thèse se déroule dans les meilleures conditions.

Je voudrais apporter ma reconnaissance à Messieurs Huet et Pernollet de l'INRA de Jouy-en-Josas et Monsieur Geoffre de l'Université Bordeaux I pour leurs travaux respectivement de séquençage et de synthèse de peptide.

Je remercie Monsieur Birman et Madame Iche du laboratoire de Génétique et Physiologie du développement à l'Université de Luminy (Marseille) de m'avoir offert respectivement la possibilité de pratiquer et d'apprendre la technique de micro-injection.

Je tiens également à remercier Madame Davies et Messieurs Dow, Goodwin, O'Dell et Billeter du département de Génétique à l'Université de Glasgow ainsi que tous les membres de leurs équipes pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. Je leur dis à bientôt

pour de nouvelles et passionnantes recherches scientifiques.

Je remercie Monsieur le Professeur Taghert du Département d'Anatomie et de Neurobiologie à l'Université de Saint-Louis (Missouri) pour le don de souches de drosophiles et pour la collaboration scientifique qui j'espère ne fait que commencer.

Je veux remercier tous ceux qui dans le laboratoire m'ont soutenu et aidé :

Madame Gourdoux pour m'avoir initié au métier d'enseignant et soutenu pendant les deux années d'ATER. Je voudrais également la remercier pour sa gentillesse et ses conseils.

Madame Costes pour m'avoir appris autant de techniques et aidé à la réalisation des expériences mais par-dessous tout, pour tous les bons moments passés ensemble et pour l'aide et le réconfort qu'elle a témoigné lors des moments difficiles. Qu'elle soit assurée de mon amitié.

Madame Brunet pour son aide précieuse et indispensable, son soutien moral et sa gentillesse à toute épreuve.

Le Dr. Isabel pour le don de plasmides et des souches de drosophiles ainsi que de ses conseils avertis.

Les étudiant(e)s Trifilieff, Coles, Chidami, Castellot pour leur aide et les moments sympathiques passés ensemble.

Je voudrais également remercier Madame Cho et Monsieur Jeantet pour les nombreuses discussions très enrichissantes et très sympathiques ainsi que leur soutien.

Je ne saurais oublier tous les ami(e)s de Bordeaux et autres pour leur écoute et leur encouragement dans l'accomplissement de ce travail.

Mes derniers remerciements vont à ma famille, qui m'a soutenu et encouragé tout le long de cette thèse et en particulier Madame Taran. Enfin, je voudrais remercier mes parents pour leur confiance et leur patience tout au long de ces années.

SELIM

ABREVIATIONS

| | |
|-------|--|
| Ac | Anticorps |
| ACN | Acétonitrile |
| ADNc | ADN complémentaire |
| AHFB | Acide heptafluorobutyrique |
| ARNt | ARN de transfert |
| ARNm | ARN messenger |
| ASB | Albumine de sérum bovin |
| APO | Apoæquorine |
| ATF | Acide trifluoroacétique |
| BCIP | 5-bromo-4-choro-3-indolyl-phosphate |
| BDGP | Berkeley Drosophila Genome Project |
| DAM | Drosophila Activity Monitor |
| DEPC | Diéthylpyrocarbonate |
| DIG | Digoxigénine |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| dNTP | Déoxyribonucléotide triphosphate |
| DO | Densité optique |
| DTT | Dithiotreitol |
| EDC | 1-ethyl-3(3-diméthylaminopropyl)-carbodimide |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétra-acétique |
| EIA | Dosage immuno-enzymatique |
| GAN | Gène Artificiel de Neuropeptide |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| HPLC | Chromatographie liquide à haute performance |
| IC | Index de cour |
| Ich | Index de chaining |
| IgG | Immunoglobuline de type G |
| kb | Kilobases |
| LB | Milieu liquide de Luria-Bertani |
| NBT | 4-Nitrobleu de Tétrazolium |
| Pb | Paire de bases |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| pfu | Unité de formation de plage de lyse |
| PK | Protéinase K |
| rpm | Révolution par minute |
| SAP | Paramètre d'appel sexuel |
| SDS | Dodécyle sulfate de sodium |
| SNC | Sérum normal de chèvre |
| TH | Tampon d'hybridation |
| TMB | Tétraméthylbenzidine |
| TPA | Tampon phosphatase alcaline |
| TPS | Tampon phosphate salin |
| TPTA | Tampon phosphate, triton, azide |
| TTS | Tampon tris salin |
| UAS | Upstream activated sequence |
| UV | Ultraviolet |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside |

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION

| | |
|--|----|
| 1- Origines du concept de Neuroendocrinologie et de Neurohormone | 2 |
| 2- Localisation des cellules neurosécrétrices | 4 |
| 3- Isolement et identification des neuropeptides chez les insectes | 6 |
| 4- Les neuropeptides chez la drosophile | 8 |
| 5- Les récepteurs des neuropeptides et leurs applications potentielles | 9 |
| 6- Objectifs des travaux | 11 |

MATERIELS ET METHODES

I- MATERIEL BIOLOGIQUE

| | |
|--|----|
| 1- Le cycle biologique | 13 |
| 2- Élevage | 13 |
| 3- Prélèvement des individus et croisements | 15 |
| 4- Conditionnement des animaux | 15 |
| 4-1- Études de comportement : isolement des mâles | 15 |
| 4-2- Études de comportement : isolement des femelles | 16 |
| 4-3- Autres expériences | 16 |
| 5- Les lignées de drosophiles | 16 |
| 5-1- Lignées non générées au laboratoire | 17 |
| 5-2- Lignées issues de notre travail | 23 |
| 6- Le système d'expression UAS _G -Gal4 | 25 |
| 7- Le système UAS _G -Gal4 : croisements | 26 |
| 7-1- Pour la mesure du calcium dans les cellules principales et étoilées | 26 |
| 7-2- Pour l'ablation génétique et le sauvetage des cellules à IFamide | 26 |
| 7-3- Pour l'expression ectopique du gène de l'IFamide ou du GAN | 26 |

II- METHODES D'ETUDES DES PEPTIDES

| | |
|---|----|
| 1- Méthodes d'extraction et de séparation des neuropeptides | 27 |
| 1-1- Extraction des neuropeptides | 27 |
| 1-2- Chromatographie de partage : " Super-Sep-Pak " | 27 |
| 1-3- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) | 28 |
| 2- Préparations des conjugués protéine-peptide | 29 |
| 2-1- Méthode au glutaraldéhyde | 30 |
| 2-2- Méthode au difluorodinitrobenzène | 30 |
| 3- Dosage immuno-enzymatique : EIA compétitif | 31 |
| 4- Séquençages des peptides | 33 |
| 5- Synthèses des peptides | 34 |
| 6- Production des anticorps | 34 |
| 6-1- Injection de l'immunogène | 34 |
| 6-2- Prélèvement du sang de lapines | 34 |
| 7- Marquage des anticorps dirigés contre l'IFamide | 35 |
| 7-1- Purification des immunoglobulines de type G par l'acide caprylique | 35 |
| 7-2- Couplage de l'anticorps à la tétraméthylrhodamine | 35 |
| 8- Purification des anticorps par affinité | 36 |
| 9- Protocole d'immunohistochimie | 36 |
| 10- Mesure de l'excrétion de fluide par des tubes de Malpighi isolés | 38 |
| 11- Mesure du calcium intracellulaire dans les cellules principales et étoilées | 39 |

| | |
|--|----|
| III- METHODES D'ETUDES DES ACIDES NUCLEIQUES | 41 |
| 1- Culture bactérienne | 41 |
| 1-1- Milieu liquide | 41 |
| 1-2- Milieu solide | 41 |
| 2- Préparation d'ADN plasmidique bactérien | 42 |
| 2-1- Préparation à l'aide du kit Wizard miniprep et midiprep | 42 |
| 2-2- Préparation à l'aide du protocole easyprep | 42 |
| 3- Quantification de l'ADN | 43 |
| 4- Digestion des fragments d'ADN | 43 |
| 5- Protocoles PCR | 44 |
| 6- Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose | 44 |
| 7- Purification des fragments d'ADN | 44 |
| 7-1- Extraction des acides nucléiques | 45 |
| 7-2- Purification des produits PCR | 45 |
| 7-3- Purification et extraction de l'ADN du gel d'agarose | 45 |
| 7-3-1- La purification des fragments d'ADN (400pb-5kb) | 45 |
| 7-3-2- La purification des fragments d'ADN (10pb-200kb) | 45 |
| 8- Clonage des produits PCR | 46 |
| 9- Insertion de l'ADN par ligation | 47 |
| 10- Production de bactéries compétentes | 48 |
| 11- Transformation des bactéries compétentes | 48 |
| 12- Séquençage d'ADN | 48 |
| 13- Titration de la banque de bactériophage lambda gt11 | 49 |
| 14- Amplification de la banque | 49 |
| 15- Criblage de la banque d'expression | 49 |
| 15-1- Par la technique de PCR | 49 |
| 15-2- Par une sonde ADN-DIG | 50 |
| 15-2-1- Marquage de la sonde ADN | 50 |
| 15-2-2- Transfert sur membrane | 50 |
| 15-2-3- Hybridation | 51 |
| 16- Hybridation <i>in situ</i> sur cerveaux de larves et adultes | 51 |
| 16-1- Marquage de la sonde ARN-DIG antisens | 51 |
| 16-2- Traitement des cerveaux à la protéinase K | 52 |
| 16-3- Hybridation | 53 |
| 17- Construction des plasmides | 53 |
| 17-1- Construction de <i>pP{UAS-IFamide}</i> | 53 |
| 17-2- Construction de <i>pP{promIFa-GAL4}</i> | 54 |
| 17-3- Construction de <i>pP{UAS-GAN}</i> (<i>GAN</i> : Gène Artificiel de Neuropeptide) | 55 |
| 17-3-1- Usage biaisé des codons | 55 |
| 17-3-2- Construction de pCR-SP (SP : Signal Peptide) | 56 |
| 17-3-3- Construction de pCR-PP1 et pCR-PP2 (PP : propeptide) | 57 |
| 18- Révélation de l'expression du gène LacZ | 60 |
| IV- METHODES DE TRANSFORMATIONS GENETIQUES | 61 |
| 1- Transformation génétique | 61 |
| 1-1- Principe de la micro-injection | 61 |
| 1-2- Préparation de la solution injectée | 62 |
| 1-3- Le système d'injection | 62 |
| 1-4- Préparation des embryons et injection | 62 |
| 1-5- Soins aux embryons après injection | 63 |

| | |
|--|----|
| 2- Obtention de lignées transgéniques stables | 63 |
| 2-1- Détermination de la localisation chromosomique de l'élément P | 64 |
| 2-2- Réalisation d'un stock | 64 |
| 2-3- Détection de la présence des éléments P | 64 |
| 3- Remobilisation d'un élément P par transposition | 65 |
| 3-1- Principe de la recombinaison | 65 |
| 3-2- Croisements | 65 |
| V- METHODES D'ETUDES COMPORTEMENTALES | 66 |
| 1- Test de fertilité des mouches | 66 |
| 1-1- Analyse des mâles | 66 |
| 1-2- Analyse des femelles | 66 |
| 2- Observations de paires de mouches | 66 |
| 3- Observations de trios ou " ménage à trois " | 67 |
| 4- Comportement interactif de plusieurs mâles : Chaining | 68 |
| 5- Enregistrement et traitement des films | 68 |
| 6- Mesure du comportement locomoteur | 69 |
| 7- Statistiques | 69 |

CHAPITRE I - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE DEUX NEUROPEPTIDES : LA LEUCOKININE ET L'IFAMIDE

| | |
|---|----|
| I- INTRODUCTION | 71 |
| II- RESULTATS | 72 |
| 1- Isolement et identification de la leucokinine et de l'IFamide | 72 |
| 2- Gène de la leucokinine | 77 |
| 3- Analyse du gène et de l'ADNc codant l'IFamide | 79 |
| 4- Localisation de l'IFamide | 85 |
| 5- Localisation de l'expression des ARN messagers de l'IFamide | 89 |
| 6- Mutagenèse du gène de l'IFamide | 89 |
| 7- Obtention des lignées transgéniques | 91 |
| 8- Ablation et sauvetage des neurones à IFamide | 93 |
| 8-1- Approche utilisée | 93 |
| 8-2- Ablation des neurones à IFamide révélée par immunohistochimie | 93 |
| 8-3- Sauvetage des neurones à IFamide révélée par immunohistochimie | 95 |
| III- DISCUSSION | 97 |

CHAPITRE II - PHYSIOLOGIE DE LA LEUCOKININE

| | |
|--|-----|
| I- INTRODUCTION | 102 |
| II- RESULTATS | 105 |
| 1- Mesure de l'excrétion de fluide par des tubes de Malpighi isolés | 105 |
| 2- Mesure du calcium intracellulaire dans les cellules principales et étoilées | 106 |
| III- DISCUSSION | 108 |

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE III - PHYSIOLOGIE DE L'IFamide | 112 |
| I- INTRODUCTION | 113 |
| 1- La parade amoureuse (PA) chez la drosophile | 113 |
| 2- Modalités sensorielles impliquées dans la PA | 115 |
| 3- Déterminisme génétique, environnemental et apprentissage de la PA | 116 |
| 4- Localisation des centres neuronaux responsables de la PA | 117 |
| 5- Mâles mutants avec un comportement sexuel aberrant | 118 |
| II- RESULTATS | 122 |
| 1- Fertilité des mouches | 122 |
| 1-1- <i>Les mâles</i> | 122 |
| 1-2- <i>Les femelles</i> | 122 |
| 2- Le comportement sexuel | 123 |
| 2-1- <i>Observation de paires d'individus</i> | 123 |
| 2-1-1- Comportement des mâles envers les femelles | 123 |
| 2-1-2- Comportement des mâles envers d'autres mâles | 124 |
| 2-2- <i>Effets des gènes yellow et mini-white, sauvetage par p35</i> | 125 |
| 2-3- <i>Ménage à trois</i> | 127 |
| 2-4- <i>Comportement de Chaining</i> | 128 |
| 3- Influence des gènes impliqués dans la voie de détermination sexuelle | 132 |
| 4- Différences qualitatives du comportement de cour | 133 |
| 5- L'activité locomotrice | 134 |
| 5-1- <i>Activité locomotrice individuelle des mâles</i> | 134 |
| 5-2- <i>Activité locomotrice individuelle des femelles</i> | 135 |
| III- DISCUSSION | 137 |
| | |
| CHAPITRE IV - CONSTRUCTION ET EXPRESSION D'UN GENE ARTIFICIEL DE NEUROPEPTIDE | 143 |
| I- INTRODUCTION | 144 |
| II- RESULTATS | 148 |
| 1- Construction du précurseur artificiel de neuropeptides | 148 |
| 1-1- <i>Peptide signal et site de Kozak</i> | 148 |
| 1-2- <i>Propeptide de l'IFamide et de la drosoendomorphine</i> | 148 |
| 2- Obtention des lignées transgéniques pour l'expression du GAN et du gène de l'IFamide | 150 |
| 2-1- <i>Lignées UAS-GAN</i> | 150 |
| 2-2- <i>Lignées UAS-gène IFamide</i> | 151 |
| 3- Analyse de l'expression du gène artificiel | 152 |
| 4- Analyse de l'expression du gène de l'IFamide | 157 |
| III- DISCUSSION | 158 |
| | |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 163 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 167 |
| | |
| Liste des Travaux Scientifiques | 181 |

“ Mais à quelle fin le monde a-t-il donc été formé ? dit candide.
Pour nous faire enrager, répondit Martin. ” Voltaire, *Candide*.

L'intérêt porté à l'étude des neuropeptides chez les insectes en général et la drosophile en particulier s'explique par plusieurs raisons différentes. D'une part, les insectes servent de modèle pour la recherche fondamentale en permettant une meilleure compréhension des fonctions et des modes d'action des neuropeptides ayant des rôles vitaux dans la régulation des mécanismes physiologiques, d'autre part ils illustrent une étape remarquable dans l'évolution des systèmes régulateurs que sont le système nerveux et le système endocrinien. En plus, les nombreuses recherches qui concernent les insectes viennent du fait que nombre d'entre eux sont source de nuisance importante et même des ennemis de l'Homme. De nombreuses espèces causent des dommages économiques très importants dans l'agriculture, d'autres ont des conséquences dramatiques sur la santé publique (OMS, www.who.int/bulletin/). Bien que de nombreux pesticides existent, ils ont souvent d'autres caractéristiques peu souhaitables, comme des effets secondaires sur l'Homme, et/ou ont perdu leur efficacité car les insectes sont devenus résistants à leurs effets. Il a été suggéré que des pesticides ciblant les récepteurs de neuropeptides pourraient spécifiquement les atteindre et donc être moins nocifs pour l'environnement. Les effets de tels pesticides pourraient également être plus durables car les insectes auraient plus de mal à y devenir résistants.

Dans cette introduction générale, nous commencerons par décrire brièvement les origines et les concepts de la neuroendocrinologie et des neurohormones, aussi bien en général que chez les insectes. Ensuite, nous présenterons l'anatomie des cellules neurosécrétrices chez les insectes, et nous expliquerons comment il a été possible d'isoler et d'identifier des neuropeptides chez ces derniers. Du fait que notre modèle expérimental soit la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, il nous est apparu logique de donner un peu plus d'importance à cette espèce et à ses neuropeptides, et en particulier à ceux qui sont sujets de cette thèse. Après un bref exposé expliquant comment et pourquoi on peut utiliser le modèle drosophile pour tester des récepteurs de neuropeptides comme cibles de pesticides, nous terminerons cette introduction générale en précisant succinctement les objectifs de ce travail.

1- Origines du concept de Neuroendocrinologie et de Neurohormone

L'Homme a toujours été intrigué par les insectes comme les papillons, pas seulement pour leur beauté ou leurs couleurs magnifiques, mais aussi pour les spectaculaires changements morphologiques s'opérant durant leur cycle de vie. L'éclosion et la métamorphose des insectes sont des événements connus de tous et il n'est pas surprenant que ces processus, contrôlés par des hormones, aient attiré l'attention des physiologistes et des endocrinologistes. Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, la communication entre organes se fait par l'intermédiaire des systèmes nerveux et endocrinien. Le système nerveux est particulièrement bien adapté pour la communication rapide en contrôlant les organes à travers des neurotransmetteurs tandis que le système endocrinien, par l'intermédiaire d'hormones, exerce un contrôle sur des processus à plus long terme comme la reproduction, la croissance et le développement. Les deux systèmes de communication, nerveux et endocrinien, ne sont ni fonctionnellement, ni anatomiquement séparés mais au contraire sont étroitement liés comme cela apparaît dans les systèmes qualifiés de neuroendocriniens car constitués de neurones produisant des hormones. Les hormones sont généralement synthétisées par des cellules spécialisées qui peuvent être regroupées en glandes endocrines ou être dispersées dans le système nerveux, dans l'intestin ou dans d'autres tissus. Ainsi, le système nerveux ne produit pas que des neurotransmetteurs et/ou des neuromodulateurs mais également des neurohormones.

C'est à partir des travaux réalisés sur le développement des insectes par le Polonais Kopec que l'existence d'une neurohormone a été démontrée pour la première fois. En 1922, travaillant sur la larve du papillon *Lymantria dispar*, il a démontré que le ganglion supra œsophagien, communément appelé "cerveau", libère dans l'hémolymphe (équivalent du "sang" des vertébrés mais dépourvu de rôle respiratoire) une substance qui induit la mue du papillon. Quand le cerveau est prélevé dix jours après la mue larvaire finale, la chenille se transforme en nymphe pour ensuite émerger en papillon, mais si le cerveau est extirpé plus tôt, la larve ne se métamorphose pas en stade nymphal, mais reste bloquée au stade larvaire (chenille). En revanche si un cerveau de chenille est réimplanté dans cette même larve, la métamorphose se rétablit. Ces études, ainsi que d'autres, ont permis à Kopec de conclure que le cerveau libère dans l'hémolymphe une hormone qui est essentielle pour le passage larve-nymphe et qu'elle est libérée environ dix jours après la dernière mue larvaire. Cette découverte a démontré que des hormones peuvent être libérées par le cerveau (Kopec, 1922).

S'appuyant sur des critères morphologiques, Scharrer a mis en évidence en 1928 chez les vertébrés, l'existence, dans le cerveau, de neurones sécréteurs comparables aux cellules glandulaires endocrines. Sur ses études sur le poisson téléostéen, *Phoxinus laevis*, il a montré la nature endocrine de certains neurones hypothalamiques et leurs relations avec la neurohypophyse. Avec les méthodes histochimiques permettant une coloration spécifique du matériel élaboré dans ces cellules, Bargmann a pu mettre en évidence les sites de localisation des produits de sécrétion de ces cellules. En effet, par coloration sélective du matériel élaboré dans ces cellules par la fuchsine paraldéhyde, il a pu marquer le neurone entier et montrer que les terminaisons axonales des neurones sortent du système nerveux central pour gagner la partie nerveuse de l'hypophyse. Ainsi, il a été possible de faire la relation entre les corps cellulaires des cellules neurosécrétrices de l'hypothalamus, les axones se dirigeant vers la neurohypophyse et la libération probable d'une substance dans le sang. En effet, la forte proximité des arborisations axonales terminales de ces neurones avec le système vasculaire de la neurohypophyse a permis de penser que le matériel de neurosécrétion est libéré dans le sang (Scharrer, 1978).

Ainsi, il a été montré que le cerveau des vertébrés et des invertébrés contient des cellules qui pourraient avoir des fonctions sécrétrices. Aujourd'hui, on sait que ces cellules neurosécrétrices, appelées aussi cellules neuroendocrines, libèrent effectivement leurs neurohormones à partir des organes neurohémaux dans le sang ou l'hémolymphe, comme la neurohypophyse chez les vertébrés et les corps cardiaques chez les insectes.

Plus tard, Wigglesworth a montré, chez la punaise *Rhodnius prolixus*, que les glandes endocrines situées au niveau du thorax, appelées glandes thoraciques, sont la source de l'hormone qui induit les mues larvaires, nymphale et imaginale. Ces glandes thoraciques synthétisent une hormone stéroïde, l'ecdysone, lorsqu'elles sont activées par une autre hormone libérée par le cerveau. En effet par des expériences d'implantation de parties de cerveau contenant de grandes cellules neurosécrétrices, Wigglesworth a montré chez *Rhodnius*, que c'est dans la partie dorsale du cerveau, qui contient ces grandes cellules neurosécrétrices, qu'est produite cette deuxième hormone. L'implantation de cette région du cerveau chez un autre insecte entraîne la mue. C'est cette neurohormone, qu'on appelle l'hormone prothoracotrope ou PTTH, qui stimule la glande prothoracique, qui en réponse sécrète l'ecdysone (Wigglesworth, 1972).

2- Localisation des cellules neurosécrétrices

Chez les insectes, la mise en évidence des rôles physiologiques importants des hormones neuroendocrines a fortement stimulé la recherche sur la localisation et la morphologie des cellules neurosécrétrices. Ces études ont permis de mettre en évidence tout d'abord l'existence de plusieurs types de cellules neuroendocrines et également de déterminer les relations anatomiques de ces cellules neurosécrétrices avec les organes neurohémaux. Les différents types de cellules neuroendocrines peuvent être distingués par les propriétés de colorations différentes des produits de neurosécrétion. Les corps cellulaires sont souvent larges et lorsqu'on étudie ces cellules en microscopie électronique, on observe que le hyaloplasme contient des grains de sécrétion denses aux électrons. Ces cellules sont localisées principalement dans le protocerebron médian, appelé *pars intercerebralis*, ou le protocerebron latéral correspondant à la région postérieure dorsale du cerveau. D'autres cellules neurosécrétrices sont localisées dans le deuto- et tritocerebron et dans tous les ganglions ventraux (ganglion sous-œsophagien et ganglions thoraciques et abdominaux). Les axones des cellules neurosécrétrices médianes décussent et quittent le cerveau par deux nerfs jusqu'aux corps cardiaques où les arborisations terminales de ces axones libèrent les hormones dans l'hémolymphe. Les corps cardiaques possèdent également des cellules neurosécrétrices intrinsèques qui synthétisent et libèrent des hormones adipokinétiques et/ou hyperglycémiques. D'autres organes neurohémaux sont associés aux ganglions ventraux, ce sont les organes du système nerveux sympathique dont la structure varie considérablement d'une espèce d'insecte à l'autre. Certaines hormones sont libérées par des cellules endocrines dispersées dans l'épithélium intestinal, ou par des cellules endocrines à la surface des nerfs ou des trachées (Raabe, 1982).

Les cellules neurosécrétrices les mieux étudiées chez les insectes sont celles qui sont présentes dans la *pars intercerebralis* du cerveau. Les cellules neurosécrétrices les plus facilement visualisées et donc les plus souvent dénombrées sont celles qui sont réactives à la fuchsine paraldéhyde après oxydation par une solution acide. L'intensité de coloration d'un même type de cellule varie suivant la quantité des produits de neurosécrétion présents dans le corps cellulaire si bien que lorsque la cellule en contient très peu il est parfois difficile de la qualifier de neurosécrétrice. Initialement on croyait qu'il y avait un seul type de cellules avec deux phases différentes d'un cycle de sécrétion, constitué d'une phase d'accumulation suivie d'une phase de décharge des neurosécrétions. Il a fallu un certain temps avant d'admettre qu'il y avait au moins deux types de cellules contenant des produits de neurosécrétion

différents dans la *pars intercerebralis* des insectes. Les cellules neuroendocrines sont souvent classées en deux types, en fonction de la composition chimique supposée des produits de neurosécrétion: cellules de type A et B dont les produits de neurosécrétion sont respectivement acides et basiques (Raabe, 1982).

Cependant, Panov a montré chez les insectes holométaboles (les insectes réalisant une métamorphose complète), que le groupe médian de la *pars intercerebralis* consiste en trois types de cellules neurosécrétrices fuchsinophiles, les cellules de type A1, A2 et A3. Chez les mouches, ces trois types sont constitués de 8 cellules de type A1, 14 cellules A2 et de 4 cellules A3. Outre les cellules de type A, il y a également d'autres types de cellules dans la *pars intercerebralis* (Panov, 1976). Comme nous le verrons dans les chapitres 3 et 4 du mémoire, ce sont les cellules A3 qui produisent l'IFamide, neuropeptide qui a fait l'objet des études approfondies de ce travail.

Malgré des efforts importants pour établir des corrélations entre l'activité sécrétrice de ces cellules et les différents états physiologiques de l'insecte, il a été difficile d'attribuer des fonctions physiologiques spécifiques à des cellules neuroendocrines à quelques exceptions près. Par exemple, Charlet a identifié chez la larve de libellule salut Philippe Rosay video non fini d *Aeshna cyanea*, quatre cellules neurosécrétrices qui accumulent du matériel fuchsinophile juste avant l'exuviation adulte (émergence de la libellule adulte de sa nymphe). La destruction spécifique de ces cellules empêche l'exuviation de la larve qui meurt, faute de pouvoir sortir de son exuvie. Ainsi, il a suggéré que ces cellules produisent l'hormone d'éclosion dont la libération dans l'hémolymphe déclenche la mise en route du comportement caractéristique de l'éclosion (Charlet et Schaller, 1976). Cependant, sans la caractérisation de l'hormone d'éclosion, cette hypothèse ne pouvait pas être prouvée de façon définitive. Aujourd'hui on sait que, chez le papillon, les cellules homologues à ces quatre cellules neurosécrétrices médianes produisent en effet l'hormone d'éclosion (Horodyski et al., 1989). L'hypothèse de Charlet était donc sûrement correcte. De façon similaire on a pu identifier les cellules produisant l'hormone adipokinétique (AKH) chez le criquet migrateur, *Locusta migratoria*, et celles qui produisent l'hormone prothoracotrope (PTTH) chez la phalène *Manduca sexta* (Agui et al., 1979). Néanmoins dans tous les autres cas l'attribution définitive de fonctions spécifiques aux cellules neuroendocrines a dû attendre l'identification des

hormones produites par ces cellules et la disponibilité des anticorps spécifiques contre ces hormones pour localiser les cellules qui les produisent.

3- Isolement et identification des neuropeptides chez les insectes

L'identification chimique d'une hormone nécessite tout d'abord la mise au point d'un dosage biologique ou autre, qui permet d'identifier et, si possible, de quantifier l'hormone. Ensuite, il faut des méthodes biochimiques qui permettent de purifier l'hormone d'un extrait de façon efficace et finalement des méthodes analytiques qui permettent d'établir sa structure chimique.

Les méthodes d'isolement et d'identification des neurohormones ont été mises au point chez les vertébrés. Certaines neurohormones ont été identifiées comme étant des amines biogènes, mais la majorité se sont avérées être des protéines ou des peptides.

La première hormone protéique dont la structure a été complètement identifiée a été l'insuline F. Sanger en 1955. La meilleure méthode de séparation d'une hormone consiste à disséquer la glande endocrine qui la produit. Du fait de la petite taille des insectes, il est plus difficile d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour isoler la même quantité d'hormone que chez les vertébrés, et de plus, il serait fastidieux de disséquer les tissus. Pour un gramme de corps cardiaques il faut plus d'un million d'insectes alors que pour un gramme d'hypophyse une seule vache suffit ! Il n'est donc pas surprenant que l'identification des neuropeptides d'insectes ait progressé plus lentement que l'identification des hormones des vertébrés. Le premier neuropeptide identifié chez les insectes fut la proctoline, un pentapeptide qui stimule la contraction de l'intestin postérieur. En 1975, Starrat et Brown ont obtenu à partir de 125 kg de blattes *Periplaneta americana*, une quantité suffisante et suffisamment pure pour déterminer sa structure (Starrat et Brown, 1975). Bien que la structure de l'hormone adipokinétique du criquet migrateur, *Locusta migratoria*, ait pu être déterminée peu de temps après (Stone et al., 1976), l'identification des neurohormones chez les insectes n'a pas vraiment avancé jusqu'au développement de nouvelles méthodes de séparation de neuropeptides par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) et l'introduction de séquenceurs automatiques de protéines plus puissants. La disponibilité et l'utilisation de dosages biologiques relativement simples ont permis ensuite l'identification de nombreuses myotropines. Ces dernières, comme le suggère leur nom, sont des peptides qui

augmentent la fréquence, l'amplitude et/ou la tonicité des contractions musculaires (Holman et al., 1984).

La plupart des travaux d'isolement ont été facilités par le développement des tests biologiques comme celui de la contraction de l'intestin postérieur de la blatte *Leucophaea maderae* (Holman et al., 1984 ; 1990), de la contraction de l'oviducte du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Janssen et al., 1996) de la contraction du cœur isolé du ver du tabac *Manduca sexta* (Cheung et al., 1992), mais également d'autres préparations non musculaires comme l'excrétion d'urine primaire par les tubules de Malpighi (qui avec l'intestin postérieur assume des fonctions rénales chez les insectes). Les myotropines d'insectes ont été initialement découvertes pour leur activité myotrope, mais cela ne rend pas forcément compte de toutes les fonctions du peptide isolé. Par exemple, les leucokinines, isolées pour leur capacité à contracter l'intestin postérieur, fonctionnent également comme des hormones diurétiques en stimulant l'excrétion de fluide au niveau des tubes de Malpighi (Hayes et al., 1989 ; Veenstra et al., 1997).

Une fois l'hormone disponible en quantité et qualité suffisante pour produire des anticorps, son site de synthèse peut être déterminé, par des méthodes d'immunofluorescence, une technique initialement développée par Coons pour l'insuline (Coons et Kaplan, 1950). Cette méthode a permis de constater que certains neuropeptides d'insectes étaient présents à la fois dans l'intestin et le système nerveux, comme chez les vertébrés. Cette localisation, par immunohistochimie, dans des tissus non-nerveux a été confirmée dans quelques cas par d'autres techniques (Reichwald et al., 1994). Ainsi, le terme de "neuropeptide", introduit pour indiquer un peptide spécifique du système nerveux prend une signification plus large et devient un terme général qui désigne des hormones, neuromodulateurs et neurotransmetteurs peptidiques/protéiques produits aussi bien dans le système nerveux qu'en périphérie.

Les définitions de neurotransmetteur et d'hormone sont bien différentes, mais la localisation de certains neuropeptides suggère qu'ils peuvent agir à la fois comme hormone et comme neurotransmetteur/neuromodulateur (Nässel, 2002). C'est le site de la libération du peptide dans l'espace extracellulaire qui détermine son mode d'action. Le concept du neuropeptide fonctionnant comme neurotransmetteur/neuromodulateur était révolutionnaire au départ, mais il est maintenant accepté. Chez les vertébrés par exemple, la vasopressine,

libérée dans la circulation générale, agit comme une neurohormone sur les cellules rénales mais elle est également libérée à l'intérieur du système nerveux central où elle agit comme un neuromodulateur/neurotransmetteur.

Chez les mouches, les expériences physiologiques qui suggéraient non seulement des effets de l'insuline, mais également la production d'une substance endogène très similaire à l'insuline ont conduit à tester des anticorps dirigés contre cette hormone de mammifères en immunohistologie dans divers groupes d'insectes (Duve, 1978 ; Duve et Thorpe, 1979). Ces résultats s'étant avérés positifs, on a assisté à la généralisation de l'utilisation, chez les insectes, d'anticorps réputés spécifiques d'hormones de vertébrés. Effectivement, des anti-insuline, anti-vasopressine et des anti-gastrine par exemple reconnaissent également des cellules neuroendocrines d'insectes (Veenstra, 1984 ; 1988). Des dosages immunologiques quantitatifs existants pour ces hormones de vertébrés ont été utilisés pour isoler leurs homologues chez les insectes. Cela a permis l'identification d'un peptide apparenté à la vasopressine (Proux et al., 1987), mais en général la similarité entre les neuropeptides de vertébrés et d'invertébrés est trop faible pour pouvoir utiliser cette stratégie. D'un point de vue fonctionnel, un même neuropeptide peut avoir des rôles physiologiques tout à fait différents chez les vertébrés et chez les invertébrés, contrairement à ce que l'on a initialement cru (Duve, 1987). L'exemple caricatural est celui de la vasopressine, qui, chez le criquet migrateur *Locusta migratoria*, ne fonctionne pas comme une hormone anti-diurétique (Proux et al., 1987).

Actuellement, les séquences de plus de 300 neuropeptides d'insectes sont maintenant connues (Gäde et al., 1997). Ces séquences et celles des neuropeptides d'autres invertébrés montrent que certains peptides régulateurs sont apparus très tôt pendant l'évolution et sont aujourd'hui aussi bien présents chez les invertébrés que chez les vertébrés. C'est notamment le cas pour l'insuline, la vasopressine et les tachykinines par exemple. Même si, dans certains cas, la similarité de séquence des neuropeptides est très limitée, ce sont leurs récepteurs, dont les structures sont aussi conservées, qui démontrent que cette similarité n'est pas fortuite (Hewes et Taghert, 2001).

4- Les neuropeptides chez la drosophile

Le modèle expérimental le plus utilisé, parmi les différentes espèces d'insectes, est la drosophile. Donc pour étudier les aspects fondamentaux de la neuroendocrinologie chez les

insectes, il est logique de privilégier ce modèle plutôt qu'un autre. La possibilité de modifier le génome de la drosophile par la transformation des lignées germinales et les nombreux outils de génétique moléculaire disponibles permettent de manipuler les cellules neuroendocrines produisant des neuropeptides et en étudiant *in vivo* les conséquences physiologiques et comportementales de ces manipulations, de déduire les fonctions de ces cellules.

Cependant, malgré les avantages évidents sur le plan expérimental, il y a eu peu de travaux réalisés sur les neuropeptides de la drosophile et ce manque d'intérêt s'explique en grande partie par le fait que la petite taille de cette espèce ne facilite pas les expériences de physiologie classique. Par contre, depuis que la séquence génomique de l'espèce est complètement disponible (Adams et al., 2000) et que les outils informatique sont de plus en plus performants, les informations contenues dans le génome de la drosophile sont activement exploitées et un grand nombre de gènes de neuropeptides ainsi que leurs récepteurs ont été identifiés. Les neuropeptides sont généralement de petits peptides variables en structure ce qui ne permet pas de les identifier facilement dans les séquences du génome de drosophile. Néanmoins, leurs homologues avec les neuropeptides d'autres espèces d'insectes ont permis l'identification d'au moins 30 gènes codant des précurseurs de neuropeptides chez la drosophile, incluant 7 peptides apparentés à l'insuline (Vanden Broeck, 2001; Taghert et Veenstra, 2003). De plus, 44 gènes codant potentiellement des récepteurs de neuropeptides ont été identifiés (Hewes et Taghert, 2001). En dépit de telles avancées, les rôles physiologiques de nombreux neuropeptides de drosophile restent largement inconnus.

5- les récepteurs des neuropeptides et leurs applications potentielles

Les neuropeptides étant des régulateurs importants de nombreux processus physiologiques spécifiques, ils pourraient être de bons candidats pour perturber la physiologie de l'insecte. Du fait que les insectes sont de petite taille, ils sont très sensibles à la dessiccation et une augmentation de la perte d'eau devient vite mortelle. De la même façon, il est possible de penser qu'une stimulation prématurée de l'ovulation pourrait inhiber la reproduction. En conséquence, des neuropeptides stimulant l'excrétion d'eau ou les contractions des oviductes sont très intéressants comme modèles d'études.

Dans cette optique, l'idée d'utiliser les récepteurs de neuropeptides comme cibles potentielles pour lutter contre les insectes est déjà ancienne (Keeley et Hayes, 1987), mais peu

de progrès ont été réalisés et il n'y a toujours pas de pesticides développés sur ce principe. Plusieurs raisons expliquent ces difficultés.

En premier lieu et en admettant que l'on dispose de quantités suffisantes de peptides, l'administration externe n'est pas envisageable puisque la molécule ne traverserait pas la cuticule. La voie digestive est aussi à écarter en raison de l'inactivation par les endopeptidases qu'elle implique. Une solution possible serait l'utilisation d'agonistes non peptidiques. Un modèle remarquable est fourni par les récepteurs aux opioïdes des Mammifères. Ils sont en effet susceptibles d'être activés par des substances opiacées non peptidiques comme la morphine et l'héroïne qui agissent en lieu et place des ligands naturels (enképhalines, endorphines, dynorphines). De plus en plus chez les vertébrés, la recherche pharmacologique met au point des analogues non peptidiques des neuropeptides. De tels exemples montrent qu'il est raisonnable d'envisager de mettre au point dans le modèle insecte, des analogues (peptidiques ou non) des neuropeptides qui en déclenchant leur effet à un moment physiologiquement inadéquat pour l'animal joueraient le rôle d'un pesticide.

Cependant, une entrave à la mise au point de ce type de pesticides vient précisément du fait que si les effets ne sont pas létaux, il sera plus difficile de les détecter. On pourrait réaliser expérimentalement la liaison spécifique du neuropeptide à son récepteur, mais actuellement encore peu de récepteurs de neuropeptides d'insectes ont été identifiés. Néanmoins, ce problème est en voie de solution chez la drosophile. L'identification par l'outil informatique ("in silico") des récepteurs potentiels de neuropeptides chez la drosophile stimule très fortement la recherche de la confirmation biochimique de ces récepteurs et il est très probable que, dans peu de temps, les ligands de ces récepteurs soient bientôt tous identifiés (Park et al., 2002 ; Radford et al., 2002 ; Kubiak et al., 2002 ; Meeusen et al., 2002 ; Mertens et al., 2002 ; Garczynski et al., 2002).

Une autre difficulté pour l'utilisation des récepteurs de neuropeptides comme cibles d'action des pesticides réside dans le choix du couple ligand-récepteur le plus intéressant. Dans cette optique, le modèle expérimental fourni par la drosophile semble approprié, car il est possible de manipuler son génome. Par l'intermédiaire du système d'expression UAS_G-Gal4, il est possible de diriger l'expression de gènes dans des cellules spécifiques (Brand et Perrimon, 1993). En utilisant ce système, on pourrait diriger l'expression d'un gène artificiel codant le précurseur d'un neuropeptide dans des cellules ou des tissus spécifiques et ainsi générer des drosophiles qui synthétisent et, nous l'espérons, libèrent continuellement un neuropeptide donné. Ainsi, il serait possible de surexprimer et surlibérer un neuropeptide spécifique afin de stimuler constamment les récepteurs et donc de jouer le rôle d'un pesticide

potentiel sur ce même récepteur. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'expression ectopique (c'est-à-dire dans des cellules qui n'expriment pas le neuropeptide en lieu et en temps normal) du neuropeptide PDF (" Pigment Dispersing Factor ") et du peptide du sexe altère respectivement les rythmes circadiens chez la drosophile (Helfrich-Forster et al., 2000), et le comportement reproducteur chez la femelle (Aigaki et al., 1991).

6- Objectifs des travaux

Au moment où ont commencé les travaux décrits dans ce mémoire, la séquence génomique de drosophile n'était pas encore disponible et il n'était donc pas possible de chercher des homologues de neuropeptides par les méthodes " in silico ". De plus, peu de peptides étaient isolés et caractérisés chimiquement chez la drosophile. Nous avons donc été contraints d'utiliser les méthodes biochimiques classiques pour isoler des peptides. Le choix a été guidé en premier lieu par la disponibilité d'anticorps utilisables pour leur isolement, et en second lieu par l'intérêt potentiel que leurs récepteurs pourraient avoir comme cible pour un pesticide.

Comme nous l'avons précédemment expliqué, les neuropeptides diurétiques sont a priori intéressants dans ce contexte, et comme nous disposions d'anticorps dirigé contre les leucokinines, le choix d'isoler la ou les leucokinines présentes chez la drosophile s'est avéré logique. Les leucokinines ont été initialement isolées chez la blatte *Leucophaea maderaea* pour leurs effets myotropiques sur l'intestin postérieur. Cependant, ces peptides stimulent également l'excrétion d'urine chez différents insectes et en particulier chez la drosophile en agissant précisément sur les tubes de Malpighi. Des études immunocytologiques ont montré la présence d'immunoréactivité à la leucokinine de la blatte au niveau des cellules neuroendocrines latérales du cerveau et des cellules neuroendocrines des neuromères abdominaux du ganglion ventral chez la drosophile (Nässel et Lundquist, 1991 ; Cantera et Nässel, 1992) mais jusqu'à notre travail le ou les peptides responsables de cette immunoréactivité n'avaient pas été isolés.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à un neuropeptide potentiellement impliqué dans la régulation de l'ovulation et/ou oviposition, la Neb-LFamide, neuropeptide identifié chez la mouche *Neobellieria bullata* (Janssen et al., 1996). Ce neuropeptide a été purifié et identifié par son activité myotropique grâce au test biologique hétérologue de contraction des oviductes chez le criquet *Locusta migratoria*. Préalablement à toute purification, nous avons confirmé que l'anticorps dirigé contre la Neb-LFamide reconnaissait des cellules dans le cerveau de la drosophile.

Notre travail consistait, dans un premier temps, à isoler les deux neuropeptides qui viennent d'être évoqués. On peut se poser la question : pourquoi isoler ses peptides lorsque l'activité physiologique présumée l'est également ? Tout d'abord, Il nous est paru nécessaire de montrer que les peptides sont bien produits. Ensuite, il est important de connaître la structure des peptides en eux-mêmes chez la drosophile pour tenter de déterminer à quelles concentrations elles peuvent agir sur leurs organes cibles.

Dans un deuxième et troisième temps, nous avons déterminé respectivement les rôles physiologiques de la leucokinine et de l'IFamide. Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous décrivons la construction et l'expression d'un gène complètement artificiel d'un précurseur de neuropeptides, codant un neuropeptide endogène de la drosophile, l'IFamide, un des deux neuropeptides que nous avons identifiés.

MATERIEL ET METHODES

1- MATERIEL BIOLOGIQUE

1- Le cycle biologique

Le cycle de reproduction de la drosophile est variable selon la température ; il dure environ douze jours à la température habituelle de nos élevages, c'est-à-dire 25°C. Juste après la fécondation, les femelles pondent leurs œufs et l'embryon se développe. Le stade embryonnaire dure 24 h et à la fin de l'embryogenèse, une larve de premier stade émerge. Après 24 h environ, cette larve mue et donne une larve de deuxième stade. Après à nouveau 24 h, cette larve mue et donne une larve de troisième stade, dont la durée de vie est environ de trois jours. À la fin du troisième stade, la larve sort du milieu de culture, remonte le long du tube, s'immobilise et se transforme en pupa. Pendant le stade pupal, la larve réalise la métamorphose et 5 jours plus tard, la mouche adulte, de 2 à 3 mm de long, émerge.

2- Elevage

Les souches stocks de *Drosophila melanogaster* sont élevées et maintenues au laboratoire à la température de 25°C et une photopériode de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (8 - 20h). Les drosophiles sont élevées dans des tubes et des flacons sur un milieu nutritif préparé de la façon suivante : 18 g d'agar, 200 g de farine de maïs et 200 g de levure de bière sont ajoutés dans 2,4 l d'eau préalablement portée à ébullition. Le mélange est homogénéisé avec un mixeur. Ensuite, 120 ml d'un antifongique, le maldex (100 g de méthylhydroxybenzoate dissous dans 1 l d'éthanol 100%) sont incorporés et l'ensemble est cuit pendant 20 min. Enfin, avant que le milieu ne se gélifie, on coule environ 2 ml de ce milieu dans les petits tubes (15 x 45 mm), 15 à 20 ml dans les grands tubes qui ont été les plus couramment utilisés (30 x 70 mm) et 50 ml dans les flacons (55 x 100 mm) (Figure 1).



Figure 1 : Photos des flacons, grands tubes et petits tubes contenant le milieu d'élevage qui sont utilisés respectivement pour amplifier les lignées, pour réaliser les croisements et pour isoler individuellement les mouches.

Les souches de drosophiles utilisées pour les expériences de physiologie et de comportement réalisées dans le département de génétique à l'Université de Glasgow ont été maintenues sur le milieu préparé dans le laboratoire à la température de 23°C.

Dans certaines expériences, les drosophiles ont été maintenues pendant plusieurs jours consécutifs sur un milieu plus nourrissant qui correspond au milieu de ponte des embryons de drosophiles. Le milieu est composé de deux solutions préparées séparément : la première solution est constituée de 170 ml de jus de raisin (biologique, pour éviter des résidus de pesticides), de 10,9 g de saccharose, de 21,75 g de glucose, de 0,675 g de levure boulangère et de 4 ml de NaOH 1,25 N. La deuxième solution contient 7,5 g d'agar dans 200 ml d'eau. Les deux solutions sont stérilisées à l'autoclave, puis mélangées et 5 ml de maldex sont ajoutés ainsi que 4 ml de NaOH 1,25 N pour obtenir un pH compris entre 4,2 et 4,5. Avant que le milieu ne se gélifie, 2 ml de milieu sont coulés dans les coupelles dites de chaining (12 x 34 mm) (Figure 2) et 1 ml sur les lames de ponte.

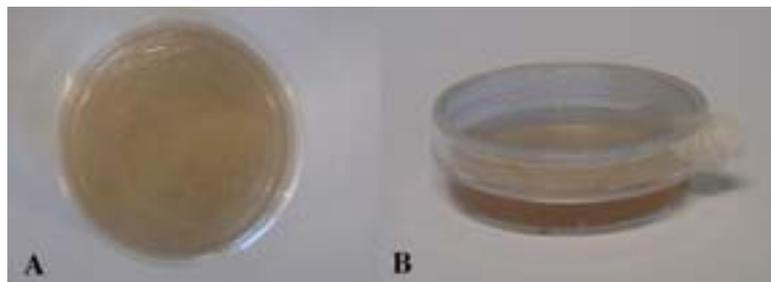


Figure 2 : Photos représentant les coupelles. En A, la coupelle est vue d'en haut, en B la coupelle est vue de côté avec une ouverture, permettant d'introduire les drosophiles, et un morceau de coton qui obture le trou et permet une bonne oxygénation.

3- Prélèvement des individus et croisements

Les femelles utilisées pour les croisements et les expériences de comportement doivent impérativement être vierges. Sachant qu'à la température de 25°C les premières mouches sont matures sexuellement au bout de 6 à 8 heures après leur émergence, il est essentiel, pour les croisements, de prélever des femelles vierges au plus tard six heures après leur émergence. Pour cela, le matin, les tubes d'élevage sont débarrassés des mouches ayant émergé la nuit. Ensuite, les mâles et les femelles venant d'émerger sont isolés toutes les quatre heures. Les femelles vierges, environ 5 à 10 individus d'une lignée, sont placées dans un nouveau tube d'élevage avec 3 ou 4 mâles d'une autre lignée. Les mouches sont transférées tous les 4 à 6 jours dans des nouveaux tubes afin d'éviter, premièrement le mélange des générations lors de l'émergence de la descendance F1, et deuxièmement une surpopulation. En évitant une surpopulation, les mouches se développeront normalement et toutes celles qui serviront pour les expériences auront une taille uniforme. Chaque tube de croisement est identifié par le génotype des parents et la date du croisement.

4- Conditionnement des animaux

4-1- Études de comportement : isolement des mâles

Les mouches sont anesthésiées au dioxyde de carbone sous une loupe binoculaire éclairée d'une lumière froide. Les mâles sont triés et séparés des femelles sur des critères anatomiques classiques (la plaque génitale et la présence de peignes sexuels sur les pattes avant). Les mâles qui seront testés pour leur comportement de cour sont ensuite isolés individuellement dans des petits tubes contenant le milieu d'élevage pendant 3 à 5 jours. L'isolement permet de s'assurer que les mâles n'ont pas eu de contact avec d'autres mouches (mâles ou femelles). De ce fait, leurs comportements de cour ultérieurs ne seront pas influencés par les expériences sexuelles. Ce " vieillissement " permet aux mouches de devenir matures sexuellement car de très jeunes mâles peuvent avoir des orientations sexuelles perturbées avec des comportements de cour entre mâles. Ainsi, l'isolement permettra de s'assurer que seulement le génotype sera responsable du comportement.

Les mâles qui serviront de cible de cour pour les autres mâles sont écartés des femelles dans les quatre heures suivant leur émergence et sont regroupés par dix dans des grands tubes et pendant la même durée de 3 à 5 jours.

4-2- Études de comportement : isolement des femelles

Les femelles utilisées pour les expériences de comportement sont récoltées toutes les quatre heures après l'éclosion, et une dizaine d'individus sont groupés dans des grands tubes pendant 3 à 5 jours avant le début des expériences de comportement de cour avec les mâles. Les femelles doivent être vierges et ainsi réceptives sexuellement pour ne pas influencer le comportement des mâles à étudier.

La veille des expériences, les mâles et les femelles sont transférés dans de nouveaux tubes contenant le milieu nutritif d'élevage additionné d'extrait de levure hydratée. Cette étape permet d'éliminer les animaux qui sont petits, qui ont des ailes mal dépliées, ou ceux qui ont une locomotion anormale. Le supplément de levure (1 goutte d'une solution constituée de 1 g de levure dissous dans 2 ml d'eau) avant le début des expériences permet d'obtenir des mouches dans des conditions optimales.

4-3- Autres expériences

Les insectes utilisés pour l'isolement des peptides sont des adultes de la souche sauvage Canton des deux sexes âgés de 7 à 14 jours puis stockés à - 80°C.

Pour les expériences d'immunohistochimie, les animaux prélevés sont, sauf indication contraire, issus de la souche sauvage ou issus des différents croisements. Les individus sont pris indifféremment de leur sexe car les expériences effectuées n'ont révélé aucune différence sexuelle dans l'expression des peptides.

Pour les expériences concernant la physiologie rénale des drosophiles, les tubes de Malpighi provenant d'adultes femelles de 3 à 7 jours ont été préférés de par leur plus grande taille et leur robustesse et ont été utilisés exclusivement ; aucune différence de quantité d'excrétion de fluide n'ayant été observée entre les deux sexes (Dow, 1994).

5- Les lignées de drosophiles

Les souches de drosophiles utilisées proviennent soit du centre d'élevage de l'Université d'Indiana (Bloomington Stock Center), soit de différents laboratoires. Certaines souches sont de type sauvage, d'autres portent des mutations. La plupart des lignées possèdent des éléments transposables ou transposons insérés dans leur génome. Ce sont des séquences d'ADN qui ont la capacité de se mobiliser de place en place sur les chromosomes. De ces éléments, la famille des éléments P est la plus largement utilisée chez la drosophile. Une des applications des éléments P est la transformation des lignées germinales qui consiste

en l'introduction de gènes manipulés *in vitro* dans l'animal et d'étudier les conséquences biologiques *in vivo*.

5-1- Lignées non générées au laboratoire

• Lignée Canton-S ou Oregon-R

Source : souche du laboratoire.

Génotype : sauvage +/+

La lignée de mouche de type sauvage est utilisée dans la quasi-totalité de nos expériences et représente la souche de référence. Elle est la plus représentative de la "drosophile normale".

Phénotype : les yeux sont rouges, soies du thorax longues, corps marron clair.

• Lignée white w^{1118}

Source : Hazelrigg et al., 1984.

Génotype : w^-

Cette souche porte la mutation w^- (white). Le gène w code une protéine membranaire nécessaire pour le transport d'un précurseur de pigment de l'œil dont l'absence rend les mouches aveugles. Les embryons de cette lignée ont été injectés avec les différentes constructions transgéniques réalisées durant notre travail.

Phénotype : yeux blancs.

• Lignée White (Canton)

Source : souche du laboratoire.

Génotype : sauvage w^-

Cette souche porte la mutation w^- , mais dont le fond génétique est celui d'une souche sauvage.

Phénotype : yeux blancs.

• Lignée Yellow-White

Source : souche du laboratoire.

Génotype : y^-w^-

Cette souche porte la mutation w^- et la mutation récessive y^- (yellow), qui code une protéine dont la fonction n'est pas connue. Sa mutation engendre un corps plus clair de couleur jaune.

Phénotype : yeux blancs, corps jaune.

• Lignée P4368

Source : Robertson et al., 1988.

Génotype : $y^-w^- ; + ; Ki1 P\{ry^{+7.2}=\Delta 2-3\}99B$

Cette souche possède les mutations w^- et y^- et *Ki* (Kinked) ainsi que l'élément P portant la séquence codante de la transposase modifiée (intron supprimé entre exons 2 et 3) permettant la transposition d'élément P dans le génome.

Phénotype : yeux blancs, corps jaune, soies dorsales raccourcies et crochues.

• Lignée 12206

Source : Bloomington.

Génotype : $y^-w^- ; P\{w^{+mc}=\text{LacZ}\} \text{Nurf-38k16102/CyO}$

Cette lignée possède le balancier CyO et porte la mutation w^- et y^- ainsi que l'élément P portant la séquence codante de la β -galactosidase sous la dépendance de la séquence UAS avec le marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux orange, corps jaunes, ailes recourbées.

• Lignée PR57

Source : souche du laboratoire, don de Heitzler P., IGBMC, Strasbourg.

Génotype : $w^- ; + ; k^D/\text{TM3 } Sb \text{ Ser}$

Cette souche possède le balancier TM3 du chromosome 3 et porte comme marqueurs, les mutations w^- , *Kd* (Kidney) *Sb* (Stubble) et *Ser* (Serrate). Les gènes *Sb* et *Ser* engendrent respectivement, lorsqu'ils sont mutés, des soies thoraciques courtes et la présence d'une encoche sur les ailes. Le marqueur *Ser* est moins utilisé car la pénétrance de la mutation est incomplète, c'est-à-dire qu'il ne s'exprime pas chez 100% des individus qui portent le gène muté.

Phénotype : yeux blancs en forme de rein, soies courtes, encoches des ailes (avec pénétrance incomplète).

• Lignée Drl/CyO

Source : souche du laboratoire, Heitzler P., Strasbourg

Génotype : $w^- ; \text{Drl/CyO}$

Cette souche possède le balancier CyO (Curly of Oyster) du chromosome 2 et porte les mutations w^- , *Drl* (Droplet).

Phénotype : yeux blancs en forme de goutte, ailes recourbées.

• Lignée 24B LacZ

Source : Zusman et al., 1985.

Génotype : w^- ; P $\{w^{+mc}=Gal4\}$ 24 B, P $\{w^{+mc}=UAS-LacZ\}$ /TM3 *Sb Ser*

Cette lignée porte la mutation w^- ainsi que deux éléments P, un portant la séquence codante de la b-galactosidase sous la dépendance de la séquence UAS avec le marqueur *mini w⁺* et l'autre la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur situé dans la région 24 B. L'expression de la b-galactosidase (après coloration) est assez étendue chez l'adulte. La lignée est maintenue à l'état hétérozygote avec le balancier du chromosome 3 (TM3).

Phénotype : yeux rouges, soies courtes, encoches des ailes ou pas.

• Lignée UAS-LacZ

Source : Brand et al., 1994.

Génotype : w^- ; P $\{w^{+mc}=UAS-LacZ\}$

Cette lignée porte la mutation w^- et l'élément P portant la séquence codante de la b-galactosidase, dont l'expression après coloration est cytoplasmique, sous la dépendance de la séquence UAS avec le marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux rouges.

• Lignée UAS-GFP

Source : Dickson et al., 1996.

Génotype : w^- ; P $\{w^{+mc}=UAS-GFP\}$

Cette souche porte la mutation w^- et l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) sous la dépendance de la séquence UAS.

Phénotype : yeux orange vif.

• Lignée UAS-mCD8-GFP

Source : Lee et al., 1999.

Génotype : w^- , P $\{w^{+mc}=UAS-mCD8-GFP\}$

Cette souche porte la mutation w^- et l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante des protéines GFP (Green Fluorescent Protein) et mCD8 sous la dépendance de la séquence UAS. La protéine mCD8 est un marqueur membranaire. La fusion des deux gènes *gfp* et *mCD8* donne une protéine fluorescente transportée tout le long de l'axone alors que la protéine GFP non fusionnée se localise plutôt dans le corps cellulaire.

Phénotype : yeux rouges.

• **Lignée UAS-hid/UAS-rpr**

Source : McNabb et al., 1997.

Génotype : y^-w^- , $P\{w^{+mc}=UAS-hid\}$, $P\{w^{+mc}=UAS-rpr\}$

Cette souche possède les mutations w^- et y^- ainsi que deux éléments P portant respectivement les séquences codantes des protéines apoptotiques Hid (head involution defective) et Reaper, tous deux sous la dépendance de la séquence UAS et associé au marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux rouge vif, corps jaune.

• **Lignée UAS-rpr**

Source : souche du laboratoire.

Génotype : w^- , $P\{w^{+mc}=UAS-rpr\}$; +

Cette souche possède la mutation w^- . Elle possède également un élément P portant la séquence codante de la protéine apoptotique Reaper sous la dépendance de la séquence UAS et un marqueur *mini w⁺* restaurant partiellement la mutation w^- . Cette souche a été obtenue en réalisant une dérecombinaison des deux éléments P présents dans la lignée UAS-hid/UAS-rpr.

Phénotype : yeux orange.

• **Lignée UAS-p35**

Source : Zhou et al., 1997.

Génotype : w^- ; $P\{w^{+mc}=UAS-p35\}$; +

Cette souche possède la mutation w^- . Elle possède également un élément P portant la séquence codante de la protéine p35, l'inhibiteur de la protéine Reaper, sous la dépendance de la séquence UAS et un marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux orange.

• **Lignée UAS-bax**

Source : Gaumer et al., 2000.

Génotype : w^- , $P\{w^{+mc}=UAS-bax\}$

Cette souche possède la mutation w^- ainsi que l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante de la protéine Bax, protéine de mammifère induisant l'apoptose, sous la dépendance de la séquence UAS.

Phénotype : yeux orange-rouge.

• **Lignée UAS-Apoequorine**

Source : Rosay et al., 1997.

Génotype : w^- ; $P\{w^{+mc}=UAS-aeq\}$; +

Cette souche porte la mutation w^- et l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante de la protéine apoaquorine sous la dépendance de la séquence UAS.

Phénotype : yeux orange.

• **Lignée UAS-Gal4**

Source : Hassan et al., 2000.

Génotype : w^- ; P{ w^{+mc} =UAS-Gal4}; +

Cette souche porte la mutation w^- et l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance de la séquence UAS.

Phénotype : yeux rouges.

• **Lignée *fruitless***

Source : Gill, 1965.

Génotype : w^- ; + ; *fru¹* / TM3 Sb Ser

Cette lignée porte la mutation du gène *fruitless*. La lignée est maintenue à l'état hétérozygote avec le balancier du chromosome TM3 possédant les marqueurs phénotypiques Sb et Ser.

Phénotype : yeux rouges, soies courtes, encoches des ailes ou pas.

• **Lignée Elav-gal4**

Source : Yao et al., 1994.

Génotype : w^- ; P{ w^{+mc} =elav-Gal4}/ CyO ; +

Cette souche porte la mutation w^- ainsi qu'un élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur du gène ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision). Il code une protéine neuronale spécifique se liant à l'ARN qui est impliquée de façon critique dans le développement neuronal et également dans la survie neuronale (Yao et collaborateurs., 1991). Ainsi, la protéine ELAV est détectée dans tous les neurones du système nerveux central et périphérique chez l'embryon, la larve, la puppe et l'adulte et aucune différence d'immunoréactivité pour la protéine ELAV n'a été trouvée dans un cerveau d'adulte de 2 ou de 20 jours (Robinow et White, 1991). La lignée est maintenue à l'état hétérozygote avec le balancier du chromosome 2 (CyO).

Phénotype : yeux rouges moins développés, ailes recourbées.

• **Lignée Appl-gal4**

Source : Torroja et al., 1999.

Génotype : y^-w^- , P{ w^{+mc} =Appl-Gal4}

Cette souche porte la mutation w^- ainsi qu'un élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance de la séquence promotrice partielle du gène *Appl* qui code l'homologue de l'APP (Amyloid Precursor Protein) chez la drosophile. Cette construction permet de diriger l'expression de la protéine avec une distribution panneurale, c'est-à-dire dans tous les neurones du système nerveux central.

Phénotype : yeux rouges, corps jaune.

• **Lignée c42**

Source : Sözen al, 1997.

Génotype : w^- ; P{ w^{+mc} =Gal4}c42

Cette souche enhancer trap (piègeur de séquence régulatrice) porte la mutation w^- ainsi qu'un élément P portant le marqueur *mini w⁺* et le gène codant le facteur de transcription GAL4 sous la dépendance de la séquence promotrice qui dirige l'expression de la protéine GAL4 dans les cellules principales des tubes de Malpighi.

Phénotype : yeux rouges.

• **Lignée c710**

Source : Rosay et al., 1997.

Génotype : w^- ; P{ w^{+mc} =Gal4}c710

Cette souche enhancer trap porte la mutation w^- ainsi qu'un élément P portant le marqueur *mini w⁺* et le gène codant le facteur de transcription GAL4 sous la dépendance de la séquence promotrice qui dirige l'expression de la protéine GAL4 dans les cellules étoilées des tubes de Malpighi.

Phénotype : yeux rouges.

• **Lignées PCrz**

Source : Isabel G., non publié.

Génotype : w^- ; P{ w^{+mc} =Crz-GAL4}; +

Cette lignée porte la mutation w^- ainsi qu'un élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur de la corazonine.

Phénotype : yeux orange vif.

5-2- Lignées issues de notre travail

• Lignée PIFA2

Génotype : w^- ; P{ w^{+mc} =promIFa-Gal4}; +

Cette lignée porte la mutation w^- ainsi que l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du facteur de transcription de levure GAL4 sous la dépendance du promoteur de l'IFamide. La mutation w^- est sauvée par le gène *mini w⁺* (w^{+mc}) porté par l'élément P et ainsi, les mouches possèdent les yeux colorés (de jaune à rouge). La lignée stock PIFA2 utilisée est maintenue à l'état homozygote avec l'élément P inséré sur le chromosome 2. Cette souche a été "cantonnée" par recombinaison pendant 5 générations avec la souche White (Canton) pour son utilisation ultérieure dans les expériences de comportement.

Phénotype : yeux orange-rouge.

• Lignée PIFA3

Génotype : w^- ; + ; P{ w^{+mc} =promIFa-Gal4}/ TM3 *Sb Ser*

Cette lignée porte la mutation w^- ainsi que l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur de l'IFamide. L'insertion de l'élément P est réalisée sur le chromosome 3 et est létale à l'état homozygote, donc la lignée est maintenue avec un balancier du chromosome 3 (TM3). Le balancier porte comme marqueurs, les mutations *Sb* (Stubble) et *Ser* (Serrate).

Phénotype : yeux orange, soies courtes, encoches des ailes ou pas.

• Lignée P₂R

Génotype : w^- , P{ w^{+mc} =UAS-rpr}; P{ w^{+mc} =promIFa-Gal4}; +

Cette lignée porte la mutation w^- ainsi que deux éléments P, un portant la séquence codante de la protéine Reaper sous la dépendance de la séquence UAS avec le marqueur *mini w⁺* et l'autre la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur de l'IFamide, avec également le marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux rouges.

• Lignée P₂HR

Génotype : y^-w^- , P{ w^{+mc} =UAS-hid}, P{ w^{+mc} =UAS-rpr}; P{ w^{+mc} =promIFa-Gal4}; +

Cette souche possède les mutations w^- et y^- ainsi que deux éléments P, dont l'un porte les séquences codantes des protéines Hid et Reaper, tous deux sous la dépendance de la séquence UAS et associé au marqueur *mini w⁺* et l'autre la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur de l'IFamide, avec également le marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux rouge vif, corps jaune.

• Lignée P₂Bax

Génotype : w^- , $P\{w^{+mc}=UAS-bax\}$; $P\{w^{+mc}=promIFa-Gal4\}$; +

Cette souche possède la mutation w^- ainsi que deux éléments P, dont l'un porte la séquence codante de la protéine Bax, sous la dépendance de la séquence UAS et associée au marqueur *mini w⁺* et l'autre, la séquence codante du facteur de transcription GAL4 sous la dépendance du promoteur de l'IFamide, avec également le marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux rouges.

• Lignée GIFA

Génotype : w^- ; $P\{w^{+mc}=UAS- \text{Gène IFamide}\}$; +

Cette souche porte la mutation w^- et l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante de l'IFamide avec son intron sous la dépendance de la séquence UAS.

Phénotype : yeux rouges.

• Lignée GAN (Gène Artificiel Neuropeptide)

Génotype : w^- ; $P\{w^{+mc}=UAS-GAN\}$; +

Cette souche porte la mutation w^- et l'élément P portant le marqueur *mini w⁺* et la séquence codante du précurseur artificiel de neuropeptide sous la dépendance de la séquence UAS.

Phénotype : yeux orange-rouge.

• Lignée GAN-Gal4

Génotype : w^- ; $P\{w^{+mc}=UAS-GAN\}$, $P\{w^{+mc}=UAS-Gal4\}$; +

Cette souche possède la mutation w^- ainsi que deux éléments P portant respectivement les séquences codantes du précurseur artificiel de neuropeptide et de la protéine GAL4, tous deux sous la dépendance de la séquence UAS et portant le marqueur *mini w⁺*.

Phénotype : yeux rouge vif.

6- Le système d'expression UAS_G-Gal4

Le système UAS_G-Gal4 a été développé pour exprimer une ou des protéines dans des tissus spécifiques (Brand et Perrimon, 1993). Cette méthode sépare l'activateur transcriptionnel de son gène cible dans des lignées distinctes ce qui permet d'un côté, de s'assurer que les lignées individuelles parentales sont viables et d'un autre côté, d'utiliser une large variété de séquences transcriptionnelles et de protéines cibles. Ainsi, ce système d'expression est dit binaire car il faut croiser deux lignées différentes de drosophile (Figure 3). Dans une première lignée, la protéine à exprimer n'est pas produite en absence de son activateur, la séquence codante du facteur de transcription Gal4 ; dans la seconde lignée, la protéine GAL4 est produite mais n'a aucune cible à activer. Seulement quand les deux lignées sont croisées, la protéine est exprimée.

La première lignée exprime l'activateur de transcription de levure Gal4 sous dépendance d'un promoteur défini qui possède les séquences régulatrices de la transcription et ainsi permet de diriger spatialement et temporellement l'expression d'un gène cible dans différents tissus ou types de cellules.

La deuxième lignée comprend la séquence codante d'une protéine cible, qui ne sera exprimée que dans les cellules où la protéine GAL4 est présente. La protéine GAL4 se fixe sur le site de liaison à l'ADN UAS_G (Upstream Activator Sequence) entraînant l'activation de la transcription du gène cible.

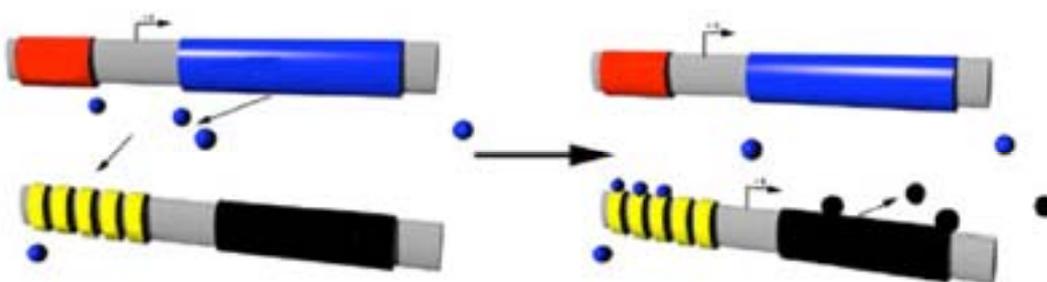


Figure 3 : Schéma représentant le fonctionnement du système UAS_G-Gal4 : à gauche, les promoteurs des gènes de neuropeptides ou enhancer trap (piègeur de séquence régulatrice) (rouge) activent l'expression du gène codant le facteur de transcription Gal4 (bleu). À droite, les protéines GAL4 produites (sphères bleues) se fixent sur le site de liaison de la séquence UAS_G (jaune) répétée cinq fois et entraînent l'activation de gènes d'intérêts (GFP, LacZ, Aequorine, Hid, Rpr, Bax, GAN)(noir) produisant ainsi les protéines correspondantes (sphères noires).

7- Le système UAS_G-Gal4 : croisements

7-1- Pour la mesure du calcium dans les cellules principales et étoilées (Chap. 2)

Les mouches transgéniques pour le transgène aequorine (UAS-aeq) sont sous le contrôle des lignées promotrices enhancer trap préalablement décrites (Rosay et al., 1997 ; Sözen et al, 1997). Elles dirigent l'expression de GAL4 dans les cellules principales (c42) ou les cellules étoilées (c710) des tubes de Malpighi. Pour produire des mouches qui possèdent une expression de l'aequorine spécifique aux cellules, des mouches UAS-aeq homozygotes sont croisées avec des mouches homozygotes pour ces deux lignées Gal4 et les descendants ont été utilisés.

7-2- Pour l'ablation génétique et le sauvetage des cellules à IFamide (Chap. 3)

Pour produire des mouches qui expriment spécifiquement des molécules apoptotiques dans les cellules à IFamide, une lignée promIFa-Gal4 (PIFA₂ ou PIFA₃) a été croisée soit à une lignée double transgénique UAS-hid/UAS-rpr, soit à la lignée UAS-rpr, soit la lignée UAS-bax. Nous avons, par la suite, créé des lignées stables possédant les deux ou trois transgènes précédemment cités, pour obtenir des lignées double transgéniques P₂R, P₃R P₂Bax ou des lignées triple transgéniques y⁻ P₂HR, y⁺ P₂HR.

Pour produire des mouches dont les neurones à IFamide co-expriment la protéine apoptotique Reaper et son inhibiteur p35, nous avons réalisé le croisement entre la lignée double transgénique P₂R et la lignée p35.

7-3- Pour l'expression ectopique du gène de l'IFamide ou du GAN (Chap. 4)

Pour obtenir des mouches qui possèdent une expression spécifique du gène de l'IFamide ou du gène artificiel codant un précurseur de neuropeptide, il suffit de croiser des lignées UAS-Gène IFamide ou UAS-GAN / UAS-Gal4 avec des lignées qui portent la séquence Gal4 sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *elav* et *appl* qui sont exprimés dans tous les neurones du cerveau. Ainsi, l'expression ectopique des gènes IFa et GAN peut s'opérer de façon constitutive dans un grand nombre de cellules.

II- METHODES D'ETUDES DES PEPTIDES

1- Méthodes d'extraction et de séparation des neuropeptides

1-1- Extraction des neuropeptides

Quatre cents grammes de drosophiles (environ 1/4 de million de mouches) sont homogénéisés par quantité de 20 g dans 200 ml de la solution de Bennett's, constituée d'acide formique 5%, d'acide trifluoroacétique 1% (ATF), de NaCl 1% et d'HCl 1M dans l'eau (Bennett et al., 1981). L'extrait est broyé à haute vitesse pendant 5 min dans un mixeur Waring modèle 31BL92, (New Hartford, CT, USA). Le broyat est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 20 min à 4°C. Le culot ainsi obtenu, subit à son tour la même extraction et les surnageants contenant les peptides sont extraits par chromatographie "Sep-Pak".

1-2- Chromatographie de partage : "Super-Sep-Pak"

Ce type de chromatographie est une méthode préparatrice qui permet d'éliminer les protéines et les petites molécules hydrophiles (ions, acides...) de l'homogénat. Cette séparation, sur colonne en phase inverse, est basée sur les interactions hydrophobes liant les solutés à la phase stationnaire apolaire constituée de billes de silice greffées de chaînes alkyles C-18 (tailles des particules 55 à 105 µm, diamètre des pores 125 Å, Millipore Corporation, Bedford, MA). On parle de phase inverse car la silice dite "normale" possède une fonction hydrophile OH et ainsi peut retenir les molécules hydrophiles. Ici, la silice est greffée de chaînes hydrocarbonées donc les propriétés de polarité sont inverses de celle d'origine donc on obtient une phase inverse.

La colonne, contenant 7 g de billes de silice, est tout d'abord rincée avec 200 ml de méthanol pur, ce qui active les billes de silice en "fluidifiant" les chaînes C-18 avec lesquelles les solutés peuvent interagir, puis elle est équilibrée avec 200 ml d'eau contenant 0,1% ATF. Le surnageant est passé sur papier-filtre puis déposé sur la colonne. La colonne est ensuite lavée avec 200 ml d'ATF 0,1%. L'ATF augmente l'hydrophobicité des peptides en formant des paires d'ions, d'une part entre les groupements carboxyliques d'ATF et les groupements amines des peptides et, d'autre part en supprimant les ions carboxyles des peptides par les ions hydronium ($\text{pH} < 2$). Le mélange polypeptidique est alors élué avec 40 ml d'une solution aqueuse de 65% d'acétonitrile (ACN) et de 0,1% d'ATF, ce qui va décrocher progressivement les composés hydrophobes correspondant aux protéines et au mélange de peptides recherchés. Cette fraction est ensuite récupérée et évaporée sous vide au

Speed Vac Concentrator (Savant). Les fractions, après évaporation, sont alors stockées au congélateur à -20°C jusqu'à utilisation. Cette extraction en phase solide a été réalisée pour les 400 g de drosophiles et tous les résidus secs obtenus sont repris dans 0,1% d'ATF puis regroupés pour subir une deuxième séparation comme précédemment sur une nouvelle colonne. Cette séparation permet d'éliminer plus de protéines et de concentrer les échantillons avant les séparations en HPLC. Des expériences préliminaires ont montré que si certains pigments de drosophile ne sont pas retenus sur la colonne, aucun peptide d'intérêt n'a été perdu lors de cette étape de séparation.

1-3- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse en HPLC est réalisée sur un système Beckman Gold relié à un détecteur UV Module 168 de longueur d'onde variable et à un collecteur de fractions ISCO retrieveur 500. Pour la purification, l'extrait a été fractionné à travers une série de quatre colonnes chromatographiques dont chacune a des caractéristiques de séparation différentes. Les conditions d'opérations pour les différentes colonnes sont les suivantes :

- La première séparation en phase inverse est réalisée sur une colonne C-18 Econosil, 250 x 22,5 mm (Altech Associates, Inc. Deerfield, IL, USA). La colonne est équilibrée avec une élution isocratique d'une solution A de 0,1% d'acide heptafluorobutyrique (AHFB) dans l'eau pendant 10 min suivie d'un gradient linéaire de 0 à 20% d'une solution B de 0,1% AHFB dans 80% ACN pendant 20 min et enfin de 20 à 65% de la solution B pendant 90 min. La densité optique a été mesurée à 280 nm, longueur d'onde qui détecte les acides aminés aromatiques. L'écoulement a été réglé à 10 ml/min et les fractions sont collectées toutes les 48 secondes ce qui correspond à un volume final de 8 ml. Les fractions sont ensuite stockées à -80°C.

- La deuxième séparation en phase inverse est réalisée sur une colonne C1 Ultremex, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). La colonne est équilibrée avec une solution A de 0,1% ATF dans l'eau pendant 10 min suivie d'un gradient linéaire de 0 à 20% d'une solution B de 0,1% ATF dans 65% ACN pendant 60 min et enfin de 20 à 50% de la solution B pendant 30 min. L'écoulement a été réglé à 1 ml/min et la densité optique a été détectée simultanément à 214 nm (longueur d'onde qui détecte les chaînes polypeptidiques) et 280 nm. Les fractions de 1 ml sont collectées chaque minute dans un tube Eppendorf puis stockées à 4°C.

- La troisième séparation en phase inverse est réalisée sur une colonne Microsorb Phényl, 250 x 4,6 mm (Rainin Instrument Company, Inc, Woburn, MA, USA). La colonne est équilibrée avec un mélange de 80% d'une solution A de 0,1% ATF dans l'eau et de 20% d'une solution B de 0,1% ATF dans 65% ACN pendant 30 min suivie de différents gradients de la solution B de 20 à 30% pendant 10 min, de 30 à 50% pendant 60 min, de 50 à 60% pendant 10 min et enfin de 60 à 70% pendant 5 min. L'écoulement a été réglé à 1 ml/min et la densité optique a été détectée simultanément à 214 et 280 nm. Les fractions de 1 ml sont collectées chaque minute dans un tube Eppendorf puis stockées à 4°C.

- La quatrième séparation est réalisée sur une colonne Protein Pak I-125, 300 x 7,8 mm (Millipore Corporation). La colonne est équilibrée avec une élution isocratique de 100% d'une solution A de 0,01% ATF dans 95% ACN et 5% d'eau pendant 10 min, suivie d'un gradient linéaire de 0 à 100% d'une solution B de 0,01% ATF dans 50% ACN et 50% d'eau pendant 80 min. L'écoulement a été réglé à 1,5 ml/min et la densité optique est détectée simultanément à 214 et 280 nm. Les fractions de 3 ml sont collectées toutes les 2 min puis stockées à 4°C.

À chaque étape de purification, des parties aliquotes de 10 µl de chaque fraction sont additionnées avec 100 µg d'albumine de sérum bovin (ASB) puis évaporés au Speed Vac. L'immunoréactivité à la leucokinine et à l'IFamide de drosophile a été testée par dosage immunoenzymatique (EIA) compétitif. Les fractions positives sont regroupées, évaporées puis sont soit dissoutes dans 0,1% ATF pour les trois premières étapes de purification soit dans 0,01% ATF et 95% ACN et 5% d'eau pour la dernière étape de purification.

2- Préparations des conjugués protéine-peptide

Pour produire des anticorps contre les peptides, nous avons préparé des conjugués protéine-peptide. Du fait de leur petite taille, les peptides ne peuvent être immunogènes en eux même, donc ils sont couplés à des protéines porteuses comme la thyroglobuline ou l'albumine. Pour la quantification de peptides par EIA, nous avons également préparé des conjugués protéine-peptide. Les méthodes de couplage les plus utilisées reposent sur la présence des groupes amines libres portées par l'acide aminé lysine ou le résidu amino terminal des protéines. Il est important de rappeler que le conjugué protéine-peptide utilisé pour immuniser les lapins doit être obligatoirement différent de celui du dosage EIA. En effet, la protéine porteuse et l'agent de couplage sont tous deux immunogènes, donc les lapines

produisent également des anticorps qui reconnaissent la protéine porteuse et l'agent de couplage. Nous avons ainsi utilisé deux agents de couplage différents : le glutaraldéhyde et le difluorodinitrobenzène.

2-1- Méthode au glutaraldéhyde

Pour les dosages EIA, des conjugués de la leucokinine et de l'IFamide couplée à la thyroglobuline ont été réalisés en suivant le protocole décrit par Harlow et Lane (1988). Cinq mg de thyroglobuline (protéine porteuse) et 0,2 mg de peptide synthétique, la leucokinine II (Sigma) ou l'IFamide (synthétisé par M. S. Geoffre de l'Unité de Biophysique Structurale de l'Université Bordeaux I) sont dissous dans 2 ml du Tampon Phosphate Salin (TPS composé de 150 mM de NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ ajusté à un pH 7,4). Sous agitation constante, on ajoute, en réalisant un goutte-à-goutte, un volume de 2 ml d'une solution de 0,2% de glutaraldéhyde dans du TPS. Le glutaraldéhyde est un agent de couplage bifonctionnel qui lie les deux composés en réagissant avec des groupes amines NH₂ libres. Après incubation pendant 1 h à température ambiante, on ajoute 1 ml d'une solution de glycine dans du TPS (1M, pH 7,2) pendant 1 h sous agitation constante pour bloquer les sites réactifs restants de la glutaraldéhyde. Puis, on sépare le complexe thyroglobuline-glutaraldéhyde-peptide du peptide non conjugué à la thyroglobuline par une dialyse (Spectra/Por MWCO : 12-14,000) dans du TPS en renouvelant 4 fois la solution de TPS pendant 48 heures à 4°C.

2-2- Méthode au difluorodinitrobenzène

Cette méthode suit le protocole décrit par Tager (1976). Les conjugués ont été produits de la manière suivante : une quantité de 2 mg de peptide (dans le cas d'un conjugué destiné à être injecté aux lapines) ou 0,2 mg (dans le cas d'un conjugué utilisé dans un dosage EIA) est dissoute dans 100 ml d'une solution de guanidine hydrochloride 7 M et de phosphate de potassium 0.1 M pH 7,2. Au mélange sont ajoutés 500 ml d'une solution de 30 mg/ml de 1,5 difluoro-2,4 dinitrobenzène (DFDNB, Sigma) dissous dans du méthanol pur. La réaction de couplage s'effectue pendant 15 à 30 min à température ambiante puis le mélange réactionnel est refroidi dans la glace. La solution est lavée successivement avec plusieurs volumes d'éther diéthylique (deux fois 3 ml et une fois 6 ml) préalablement refroidi dans la glace. À chaque étape de lavage, le contenu du tube est mélangé vigoureusement au vortex, centrifugé brièvement au froid (4°C) et le surnageant est éliminé. À cette étape, l'extraction de l'excès de DFDNB qui n'a pas réagi est presque totale car, contrairement au peptide, le DFDNB est

soluble dans l'éther. Ensuite, le précipité jaune, contenant le peptide-FDNP et les différents sels, est laissé sécher pendant 1 heure à température ambiante.

Le peptide activé est ensuite couplé à l'ASB (RIA grade, Sigma). Pour cela, 100 ml d'une solution contenant 5 mg d'albumine dissoute dans 0,4 M de sodium borate pH 10 sont ajoutés au précipité peptidique. Après incubation à température ambiante pendant 1 heure pour laisser évaporer l'éther résiduel, le tube est fermé et placé à l'abri de la lumière pendant 24 h à température ambiante pour permettre la formation du conjugué protéine-peptide (peptidyl-dinitrophényl-albumine). Pour éliminer les sels restants, une dialyse est réalisée (Spectra/Por MWCO : 12-14,000) dans du TPS en renouvelant 4 fois la solution de TPS pendant 48 heures à 4 °C.

3- Dosage immuno-enzymatique : EIA compétitif

Ce dosage EIA permet de détecter et de quantifier des petites molécules comme les peptides. Cette technique est réalisée selon la méthode décrite par Kingan (1989). Le principe repose sur une compétition pour l'anticorps entre l'antigène adsorbé sur la paroi des puits sous forme d'un conjugué protéine-peptide et l'antigène libre à doser. La liaison du conjugué avec l'anticorps va être inversement proportionnelle à la quantité d'antigènes libres présents dans les échantillons à tester ou à celle des standards. Cette liaison est quantifiée par la peroxydase couplée à une immunoglobuline dirigée contre l'anticorps primaire de lapin soit de la leucokinine I produit par le Professeur Nässel à l'Université de Stockholm (Nässel et Lundquist, 1991), soit de la LF amide produit par l'équipe du Professeur De Loof à l'Université de Louvain (Belgique) (Janssen et al., 1996), soit de l'IFamide (voir p. 31).

Les EIA dirigés contre la leucokinine I, la LFamide et l'IFamide ont été mis au point en deux temps (Tableau 1) :

- Dans un premier temps, on fait varier la concentration de conjugué adéquat (2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 500 ng par puits) et de l'anticorps adéquat en réalisant une gamme de concentration décroissante (1/10 000 ; 1/50 000 ; 1/100 000 ; 1/200 000 ; 1/500 000) en l'absence du peptide, afin de connaître les concentrations les plus adaptées pour obtenir une densité optique aux alentours de 1,5.
- Dans un second temps, on applique une concentration de conjugué et une concentration d'anticorps optimales préalablement définies, et l'on teste différentes concentrations de peptides afin de pouvoir obtenir une courbe dose-réponse optimale.

| | <i>Leucokinine I</i> | <i>LFamide</i> | <i>IFamide</i> |
|------------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| Conjugué EIA | Thyr-Glut-LK I | ASB-DFDNB-IFamide | Thyr-DFDNB-IFamide |
| [Conjugué] (ng)/puits | 100 | 250 | 125 |
| Conjugué AC | ASB-DFNDB-LK1 | Thyr -EDC-LFamide | ASB- Glut-IFamide |
| [Anticorps] | 1/200 000 | 1/60 000 | 1/500 000 |
| ED 50% (femtomoles) | 20 | 30 | 900 |

Tableau 1 : Concentrations idéales de conjugués et d'anticorps déterminées pour les dosages dirigés contre la leucokinine I, la LFamide et l'IFamide.

En détail, on incube la plaque EIA (plaque de 96 puits) sous agitation à 100 *rpm* pendant 3 heures à 37°C avec la quantité préalablement définie de conjugué dissoute dans 50 µl de TPS, puis on distribue dans chaque puits 200 µl d'une solution de 5% de lait écrémé en poudre dans du TPS pour saturer les sites d'adsorption dans les puits. La plaque est agitée (100 *rpm*) pendant 1 heure à température ambiante.

Ensuite on dépose 50 µl par puits d'une gamme de dilution de quantités croissantes de peptides standard respectivement de: 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30 ; 100 ; 1000 ; 10 000 femtomoles. Les échantillons issus des différentes séparations chromatographiques en HPLC, additionnés de 100 µg de ASB sont évaporés au Speed Vac puis repris dans 125 µl de sérum normal de chèvre (1% SNC dans du TPS). Des parties aliquotes de 50 µl de chaque fraction sont déposées en duplicata dans les puits. Cinquante µl d'anticorps spécifique de la leucokinine I, de la LFamide ou de l'IFamide dilués respectivement au 1/200 000, 1/60 000 et 1/500 000 dans le TPS sont appliqués et la plaque, recouverte d'un film plastique, agitée (100 *rpm*) une nuit à 4°C.

Le lendemain, la plaque est agitée pendant 1 heure à température ambiante puis retournée et rincée avec une solution de TPS additionnée de 0,05% Tween 20 (polyoxyéthylènesorbite monolaurate). La plaque est agitée pendant 5 min et le lavage est répété 2 fois à des intervalles de 5 min.

Une solution d'anticorps secondaire, anti-immunoglobulines G de lapin couplées à la peroxydase et purifiées par affinité (Roche Biochemicals), est préparée à la concentration de 1/1000 et 70 µl sont appliqués dans chaque puits. La plaque subit une agitation pendant 1 heure à température ambiante puis est retournée et rincée 4 fois comme préalablement à des intervalles de 5 min.

Les complexes antigènes-anticorps sont quantifiés en mesurant l'activité enzymatique de la peroxydase présente dans chaque puits. Le réactif de révélation, préparé extemporanément, est constitué en mélangeant successivement:

- 2,5 ml de solution-mère du tampon de révélation constitué de 1 M d'acétate de sodium ajusté à pH 6 avec 1 M d'une solution d'acide citrique.
- 21,75 ml d'eau distillée (soit un tampon final à 0,1 M pH 6).
- 500 µl d'une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) à 5 mg/ml dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO).
- 250 µl de solution de peroxyde d'urée à 1% (concentration finale à 0,01%).

On applique 75 µl de cette solution dans chaque puits et la plaque est mise à agiter à l'obscurité pendant 30 min. Il apparaît une coloration bleue (mesurable à 650 nm) qui se développe en quelques minutes et atteint son maximum en 45 min puis décroît. La réaction est arrêtée et amplifiée avec 75 µl de 1 M H₂SO₄ par puits qui donne une coloration jaune très intense. L'intensité de coloration est mesurée par un lecteur de plaque (Spectra MAX 340, Molecular Devices) à une longueur d'onde de 450 nm. Ce dosage permet de tracer une courbe dose-réponse et de déterminer la dose effective (ED) de standard permettant 50% de complexation avec le conjugué. Cette ED 50% est environ de 20, 30 et 900 femtomoles par puits pour les EIA de la leucokinine, LFamide et l'IFamide respectivement, ce qui confirme la sensibilité de ce dosage pour la leucokinine et la LFamide et son insensibilité pour l'IFamide.

4 - Séquençages des peptides

Les structures primaires de la leucokinine et de l'IFamide de drosophile ont été déterminées par Mrs J.C Huet et J.C Pernollet de l'Unité de recherche de Biochimie et Structure des Protéines de l'INRA de Jouy-en-Josas à l'aide d'un séquenceur automatique de protéines (Perkin Elmer Applied Biosystem Procise 494 A). L'analyse des séquences protéiques est réalisée par la dégradation d'Edman (Han et al., 1985). La chimie de la dégradation d'Edman est une méthode cyclique qui consiste à coupler la phénylthiocyanate (PITC) aux acides aminés les uns après les autres à partir de leurs parties N-terminales, puis à libérer par une hydrolyse acide les dérivés phénylthiohydantoïnes (PTH) qui vont être ensuite analysés. Il est à noter que pendant ce processus, la PITC-Gly-amide est changée en PTH-Gly et ainsi la méthode d'analyse de la séquence ne permet pas de déterminer si la partie C-

terminale du peptide correspond à une amide ou non ce qui a une importance pour la détermination finale de la structure d'un peptide.

5- Synthèses des peptides

La leucokinine, Asn-Ser-Val-Val-Leu-Gly-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-His-Ser-Trp-Gly-amide, et l'IFamide, Ala-Tyr-Arg-Lys-Pro-Pro-Phe-Asn-Gly-Ser-Ile-Phe-amide, de drosophile ont été synthétisées par M. S. Geoffre de l'Unité de Biophysique Structurale de l'Université Bordeaux I à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides (Applied Biosystem modèle 341 A). La drosoendomorphine, Asp-Asp-Ala-Glu-Glu-Asp-Asp-Tyr-Pro-Trp-Phe-amide, et le peptide apparenté au précurseur de l'IFamide Leu-Arg-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Val-Ser-His-Val-Val-Ser-Pro-Glu-Arg-Gln-Gln-Ile-Gly ont été synthétisés sur notre commande par Research Genetics.

6- Production des anticorps

Trois lapines issues de la race New Zealand White ont été utilisées pour produire des anticorps dirigés contre l'IFamide, deux lapines pour produire des anticorps dirigés contre une séquence du précurseur de l'IFamide, et deux lapines pour produire des anticorps dirigés contre la drosoendomorphine. Toutes les lapines étaient jeunes (moins de trois mois) au moment de leur première injection, sauf la deuxième lapine utilisée pour la drosoendomorphine qui avait 9 mois. Avant l'immunisation, le sérum pré-immun est collecté et testé en immunohistochimie pour d'éventuelle fausse immunoréactivité positive.

6-1- Injection de l'immunogène

Pour la première injection, une quantité de 250 µg de conjugué est additionnée de 750 ml de TPS filtré et de 750 ml d'adjuvant complet de Freund puis mélangé vigoureusement jusqu'à émulsion. L'injection de 1 ml est réalisée de façon sous-cutanée à 5-8 endroits différents. À partir de la deuxième injection, l'adjuvant complet de Freund est remplacé par l'adjuvant incomplet, et la quantité du conjugué diminuée de moitié. Le temps entre les injections est environ 6 semaines.

6-2- Prélèvement du sang de lapines

Le sang est collecté en sectionnant superficiellement une veine de l'oreille qui est connectée à un dispositif relié à une pompe à vide pour permettre de récupérer le sang. Après prélèvement, le sang est laissé à température ambiante pour permettre sa coagulation. Le

surnageant correspondant au sérum est récupéré et stocké au congélateur à - 80°C, et une fraction aliquote de 200 ml additionnée d'un même volume de glycérol est conservée à - 20°C.

7- Marquage des anticorps dirigés contre l'IFamide

7-1- Purification des immunoglobulines de type G par l'acide caprylique

L'acide caprylique permet de précipiter la majorité des protéines plasmatiques à l'exception des immunoglobulines G. Le protocole utilisé est celui décrit par Harlow et Lane en 1988. Un volume de 10 ml de sérum (IFamide janvier et IFamide juin respectivement) est mélangé avec 20 ml d'un tampon d'acétate de sodium 60 mM (pH 4) et le pH est ajusté à 4,8. L'acide caprylique est ajouté en réalisant un goutte-à-goutte d'un volume de 750 µl et le mélange est homogénéisé pendant 30 min à température ambiante. Le tout est centrifugé à 5000 g pendant 10 min. Le surnageant subit une dialyse contre l'eau Milli Q pendant deux jours en changeant 5 fois l'eau. Les immunoglobulines dialysées (environ 25 ml) sont lyophilisées au Speed Vac et prêtes pour être couplées à un fluorochrome.

7-2- Couplage de l'anticorps à la tétraméthylrhodamine

Il existe de nombreux réactifs fluorescents permettant la conjugaison des anticorps aux protéines. Nous avons utilisé le succinimidyl ester de 5- (et 6-) carboxytétraméthylrhodamine qui, comme tous les esters succinimidyl, réagit, en condition de pH basique (environ pH 8 à 10), avec les amines des protéines (essentiellement des acides aminés lysine).

Une quantité de 10 mg de lyophilisat d'immunoglobulines est dissous dans 0,5 ml de bicarbonate de sodium 0,15 M pH 8,3 et 250 µl de cette solution protéique de 20 mg/ml est ajoutée à 25 µl d'une solution de tétraméthylrhodamine succinimidyl ester (Molecular Probes, Oregon, USA) à une concentration de 10 mg/ml dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Le mélange est rapidement vortexé et incubé à température ambiante pendant 1 h sous agitation constante. Ensuite, les anticorps marqués sont aisément séparés du reste du réactif en utilisant une colonne gel filtration (9 x 40 mm) de Sephadex G-50 préparée dans le corps d'une seringue jetable de 4 ml. La colonne est équilibrée avec 5 à 10 ml de TPS puis la solution d'anticorps est déposée sur la colonne et l'anticorps est élué avec du TPS. La première fraction colorée (rose foncé) qui élue contient les anticorps marqués, alors que la deuxième fraction (rose clair) contient le colorant libre. L'absorbance à 280 nm (I_{\max} des protéines) et 555 nm (I_{\max} de la tétraméthylrhodamine) est mesurée et la DO à 280 nm, après correction pour l'absorbance à 280 nm due à la rhodamine, permet le calcul de la concentration de

protéines dans l'échantillon (1,4 unités de DO est égale à 1 mg/ml de IgG), alors que la DO à 555 nm permet de calculer la quantité du fluorochrome incorporé dans la protéine (degré de marquage).

- Correction de la contribution de l'absorbance du colorant à 280 nm :

$$A_{280 \text{ protéine}} = A_{280} - I_{\text{max}} \cdot CF \text{ avec } CF = A_{280 \text{ colorant libre}} / A_{\text{max colorant libre}}$$

Le facteur de correction (CF) de la tétraméthylrhodamine à 280 nm est de 0,3.

- Calcul du degré de marquage (DM) :

$$DM = I_{\text{colorant}} \times PM / [\text{protéine}] \times e_{\text{colorant}} \quad PM = 155000 \text{ et } e_{\text{colorant}} = 65000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

Ensemble ces deux mesures permettent d'estimer le nombre moyen de fluorochromes conjugué à une IgG. Ensuite, les anticorps marqués sont additionnés d'ASB et de sodium azide pour des concentrations finales de 10 et 1 mg/ml respectivement. Une fraction aliquote de 250 µl, pour les marquages immunologiques, est stockée à 4°C et le reste est gardé à - 80 °C.

8- Purification des anticorps par affinité

La purification des anticorps endomorphine-1 de vertébré par affinité pour le FMRFamide a été réalisée sur une colonne " HITrap NHS-activated Sepharose Hight Performance ". Selon le protocole décrit par le fabricant (Pharmacia Biotech), 5 mg de FMRFamide sont couplés sur la colonne. Préalablement au passage de l'anticorps, le sérum polyclonal est centrifugé pendant 10 min à 13 000 *rpm*. Un volume de 1 ml de sérum est dilué 10 fois dans 10 mM Tris pH 7,5, puis la totalité du sérum dilué est passée trois fois sur la colonne pour permettre une absorption maximale des anti-endomorphine-1 reconnaissant le FMRFamide. Les anticorps, non retenus par la colonne, sont additionnés de 1% de sérum bovin d'albumine et 0,1% d'azide. Une fraction aliquote de 250 µl additionnée d'un même volume de glycérol, pour les marquages immunologiques, est stockée à - 20°C.

9- Protocole d'immunohistologie

Les systèmes nerveux sont disséqués à partir de larves de 3^{ième} stade larvaire (3 à 5 jours), de pupes (2 jours) et d'adultes (4 jours) dans du NaCl 9‰ suivant le protocole de dissection issu du site <http://jfly.nibb.ac.jp/html/movie/> puis les tissus sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 2 heures à température ambiante ou à 4°C toute la nuit sous agitation douce. La solution de fixation est réalisée de la manière suivante : 10 g de paraformaldéhyde sont dissous sous agitation dans 110 ml d'eau distillée en chauffant la

solution à 60°C, puis quelques gouttes de NaOH 1N sont ajoutées jusqu'à ce que la solution devienne transparente. La solution est complétée à 125 ml avec de l'eau distillée et additionnée de 125 ml de tampon sodium phosphate (0,2 M, pH 7,4).

Après la fixation, les tissus sont lavés 6 fois à température ambiante pendant 15 min chacun, sous agitation douce, dans la solution de lavage composée de tampon de phosphate de sodium, 0,15 M pH 7,4, 0,5% triton 100X, 0,1% sodium azide (TPTA). Puis, les tissus sont pré incubés pendant 1 à 2 h à température ambiante, sous agitation douce, dans une solution de 10% de sérum normal de chèvre (SNC) dilué dans le TPTA. Ensuite, les tissus sont incubés pendant la nuit à 4°C dans une solution de TPTA 10% SNC en présence de l'anticorps approprié (Tableau 2).

| <i>Anticorps</i> | <i>Dilution finale</i> | <i>Provenance et date</i> |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>LFamide</i> | 1/1000-1/2000 | Janssen et al., 1995 |
| <i>IFamide</i> | 1/4000 | #604, 19 Juillet 2000 |
| <i>IFamide-rhodamine</i> | 1/400 | #604, 27 Juin 2000 |
| <i>Drosoendomorphine</i> | 1/1000 | #ATH, 28 Janvier 2002 |
| <i>Endomorphine-1</i> | 1/2000 | Cioffi-Tramu, 17 Août 1998 |
| <i>Corazonine-rhodamine</i> | 1/400 | Veenstra, Avril 1991 |
| <i>mCD8a</i> | 1/200 | Caltag, Burlingame, CA |
| <i>Fru^M</i> | 1/300 | Billeter, Glasgow |

Tableau 2 : Noms, concentrations et provenances des différents anticorps primaire utilisés.

Le lendemain, les tissus sont lavés à température ambiante 6 fois pendant 15 min chacun, sous agitation douce, dans la solution de lavage TPTA. Ils sont ensuite pré incubés dans une solution de 10% de SNC dilué dans la solution de lavage pendant 1 à 2 h à température ambiante, sous agitation douce. Ceci est suivi par une incubation à 4°C pendant la nuit, sous agitation, avec l'anticorps secondaire fluorescent anti-immunoglobuline de lapin dilué à 1/1000 dans une solution de 10% de SNG dans la solution de lavage.

Le lendemain, les tissus sont lavés à température ambiante 6 fois sous agitation douce, puis sont incubés dans des bains successifs de 15 min chacun à 20%, 50% et 80% glycérine dans du tampon sodium carbonate (0,04 M, pH 9,4). Les tissus sont montés entre lame et lamelle dans le tampon sodium carbonate 80% glycérine et observés au microscope à fluorescence à la longueur d'onde adéquate.

Dans la plupart des expériences d'immunohistochimie, l'anticorps secondaire utilisé est marqué par la rhodamine ou le texas red (1/1000, Roche Biochemicals ou Jacksons Immunochemicals respectivement) qui apparaît en rouge au microscope, mais nous avons également utilisé l'anticorps directement couplé à la rhodamine, ce qui ne nécessite pas l'ajout d'un anticorps secondaire. Pour certaines expériences, nous avons utilisé l'anticorps secondaire marqué par Alexa Fluor 488 (1/200, Molecular Probes) qui apparaît en vert au microscope.

10- Mesure de l'excrétion de fluide par des tubes de Malpighi isolés

Chez la drosophile, les tubes de Malpighi sont au nombre de quatre et leur structure est relativement simple : les deux tubes antérieurs contiennent un segment initial avec des concrétions de corps blancs et un segment principal, rejoint par un étroit segment transitionnel. Par contre, les deux tubes postérieurs possèdent seulement le segment principal. Chaque paire de tubes possède un uretère commun qui s'ouvre à la jonction entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur (Figure 4).

Des femelles adultes âgées de 3 à 10 jours provenant de la souche Oregon sont anesthésiées au dioxyde de carbone et disséquées dans le milieu de Schneider (Gibco BRL). La dissection consiste à saisir l'abdomen latéralement avec 2 paires de pinces fines et à ouvrir le corps. Les deux moitiés sont séparées pour bien dérouler l'intestin. Chaque paire de tubes antérieurs et postérieurs est sectionnée à sa jonction avec l'uretère commun connecté à l'intestin. Aucune différence de niveau d'excrétion de fluide n'ayant été observée auparavant, entre les tubes antérieurs et postérieurs (Dow et al., 1994), les deux ont été utilisés pour la mesure de sécrétion de fluide.

Pour la sécrétion de fluide, le milieu est constitué d'un mélange 1:1 du milieu de Schneider et de tampon salin (117,5 mM NaCl; 20 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 8,5 mM MgCl₂; 10,2 mM NaHCO₃; 4,3 mM NaH₂PO₄; 8,6 mM d'acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique; 20 mM glucose; pH 6,75).

Des gouttes de 9 µl de ce milieu physiologique sont placées dans des dépressions creusées dans de la paraffine coulée dans une boîte de pétri recouverte d'huile minérale translucide saturée d'eau pour prévenir l'évaporation. Une paire de tubes de Malpighi, toujours reliée par leur attache correspondant à l'uretère commun, est transférée dans chaque goutte. Un tube est sorti de la goutte pour être enroulé autour d'une minutie à laquelle il

adhère par sa tension de surface. L'autre tube baigne dans le milieu physiologique et le fluide excrété émerge au niveau de l'uretère commun (Figure 4).

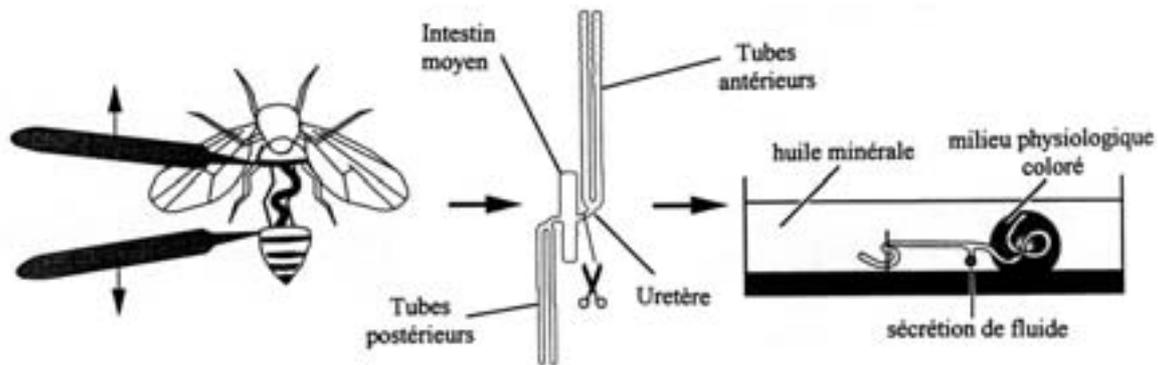


Figure 4 : Schéma du prélèvement d'une paire de tubes de Malpighi et de son montage dans le milieu physiologique pour la mesure de l'excrétion de fluide.

Le fluide excrété est prélevé tous les 10 min et le volume sécrété dans l'huile est estimé en mesurant, le long d'un petit axe, la gouttelette excrétée avec un micromètre oculaire. L'excrétion de fluide a été mesurée pendant une période contrôle de 30 minutes. Après addition de 1,5 μ l de la leucokinine de drosophile dans le tampon salin, l'excrétion de fluide a été mesurée pendant encore 30 min. Les résultats sont exprimés par une augmentation d'excrétion de fluide pour un tube de Malpighi isolé. Chaque tube a été utilisé pour une seule concentration.

11- Mesure du calcium intracellulaire dans les cellules principales et étoilées

Pour diriger l'expression de gènes cibles comme celui de l'apoæquorine dans des cellules spécialisées, il suffit de croiser des lignées exprimant l'activateur de transcription de levure GAL4 dans des sous-types de cellules au niveau des tubes de Malpighi (O'Donnell et al., 1996 ; Rosay et al., 1997 ; 1999 ; Sözen et al., 1997) avec des lignées comprenant la séquence codante de l'apoæquorine.

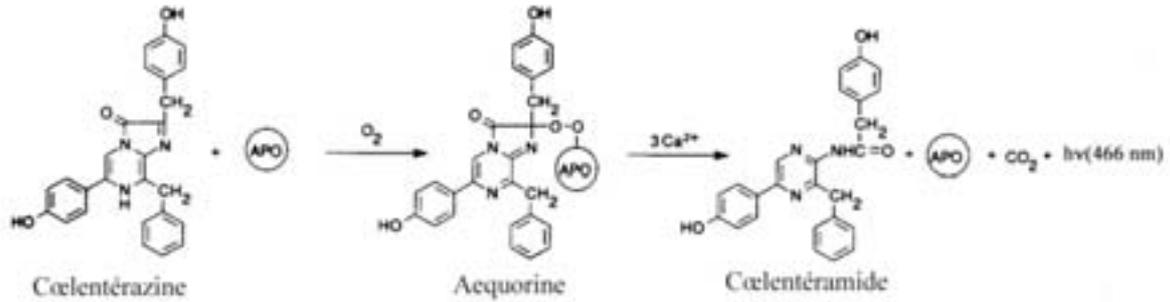


Figure 5 : Constitution de l'æquorine à partir de l'apoæquorine (APO), la coelentérazine et de l'O₂; et sa décomposition en coelentéramide, en APO et CO₂ avec émission de luminescence après fixation de 3 atomes de calcium.

L'æquorine est une photoprotéine isolée du cœlentéré *Aequorea victoria*, qui émet de la lumière bleue en présence de Ca²⁺. C'est un complexe formé d'apoæquorine, un polypeptide de 22 kDa, et de coelentérazine, un luminophore hydrophobe. Lorsque trois ions Ca²⁺ se fixent à ce complexe, la coelentérazine est oxydée en coelentéramide avec une libération concomitante de dioxyde de carbone et de lumière bleue avec un maximum d'émission à environ 466 nm (Figure 5). La bioluminescence de l'æquorine permet une mesure des concentrations de Ca²⁺ allant d'environ 0,1 µM à plus de 100 µM (Haugland, 1997).

Les lignées c42 et c710, qui expriment la protéine GAL4 dans les cellules principales et étoilées des tubes de Malpighi respectivement, ont été utilisées pour les mesures du calcium intracellulaire. Vingt tubes de Malpighi d'adultes âgés de 3 à 10 jours ont été disséqués dans le milieu de Schneider et placés dans un tube contenant 160 µl de ce même tampon. Pour la reconstitution de l'æquorine intracellulaire, on a ajouté de la coelentérazine à une concentration finale de 2,5 µM. Les tubes sont incubés à l'obscurité pendant 4 à 6 heures. L'enregistrement de la bioluminescence a été réalisé par un luminomètre LB9507 (Berthold Wallac), qui permet d'enregistrer toutes les 100 ms.

La quantification exacte du niveau de calcium intracellulaire à tout moment de l'expérimentation nécessite que la luminescence totale (la somme de l'æquorine reconstituée) soit connue, et que seulement une petite fraction soit consommée pendant l'expérimentation. Par conséquent, à la fin de chaque addition du peptide, les tissus sont lysés dans 350 µl d'une solution de lyse (1% Triton X-100, 100 mM CaCl₂) entraînant la décharge de l'æquorine restante et permettant l'estimation de la quantité totale d'æquorine dans l'échantillon. Dans chaque expérimentation, moins de 2% d'æquorine disponible a été déchargée pendant la

phase de mesure. La concentration de calcium intracellulaire a été calculée en intégrant la luminescence obtenue après addition de différentes concentrations du peptide par rapport à la luminescence totale.

III- METHODES D'ETUDES DES ACIDES NUCLEIQUES

1- Culture bactérienne

Les cultures de bactéries sont effectuées soit dans le milieu liquide de Luria-Bertani (LB) soit sur le milieu solide LB avec de l'agar. La croissance bactérienne est réalisée à 37°C avec un antibiotique, l'ampicilline, permettant la sélection de ces bactéries.

1-1- Milieu liquide

Les bactéries sont cultivées de 12 à 16 heures dans un incubateur à 37°C, sous-forte agitation (250 rpm) dans le milieu LB. Pour un litre de milieu, 10 g de peptone sont ajoutés à 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl, le mélange est dissous sous agitation dans 950 ml d'eau Milli Q et le pH ajusté à 7 avec du NaOH 5 M. La solution finale, complétée à un litre est autoclavée à 120°C pendant 20 min. L'antibiotique, permettant la sélection des bactéries, est ajouté au moment d'ensemencer le milieu avec les bactéries. Dans toutes nos cultures bactériennes liquide, nous utiliserons l'ampicilline à une concentration de 50 mg/ml.

1-2- Milieu solide

La composition du milieu solide est la même que celle du milieu liquide, excepté la présence d'agar (Top-agar : LB additionné d'agar 7 g/L ; Boîte de Pétri : LB additionné d'agar 15 g/L). Le milieu est ensuite autoclavé, tiédi puis l'antibiotique ampicilline est ajoutée à une concentration de 100 mg/ml. Le milieu est alors coulé dans des boîtes de Pétri puis celles-ci sont laissées 10 min, à température ambiante afin que le milieu gélifie, puis retournées toute la nuit pour éviter le dépôt de condensation sur le milieu et stockés le lendemain à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2- Préparation d'ADN plasmidique bactérien

2-1- Préparation à l'aide du kit Wizard miniprep et midiprep

La préparation d'ADN plasmidique (miniprep) est réalisée à l'aide du kit commercial Wizard miniprep (Promega). Après centrifugation (Microcentaur Sanyo) de 5 ml de bactéries

(14 000 g, 5 min), le culot bactérien est repris dans 250 ml d'une solution de resuspension cellulaire (contenant 100 mg/ml de RNase A, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM), puis les bactéries sont lysées en ajoutant 250 ml d'une solution de lyse (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Le lysat subit une protéolyse alcaline par ajout de 10 ml d'une solution de protéase puis 350 ml de solution de neutralisation (acétate de potassium 0,76 M, guanidine hydrochloride 4,1 M, acide acétique glacial 2,1 M, pH 4,2) est ajoutée à l'échantillon. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation (14 000 g, 5 min). Le surnageant est déposé sur une mini-colonne qui contient une résine qui fixe l'ADN plasmidique. La colonne est ensuite lavée avec 750 ml d'une solution contenant 60 mM d'acétate de potassium, 10 mM de Tris-HCl pH7,5 et 60% d'éthanol. La résine est asséchée par centrifugation (14 000 g, 2 min) puis la colonne est réhydratée (250 ml, 2 min). L'ADN plasmidique dissous dans l'eau est élué à son tour par centrifugation (14 000 g, 1 min).

Le principe de purification de l'ADN plasmidique par le kit commercial Wizard midiprep est similaire au kit miniprep. Le volume de culture bactérienne utilisée est dix fois plus important (50-100 ml) pour ce kit. La quantité d'ADN plasmidique purifié avec le kit Wizard miniprep et kit Wizard midiprep est de l'ordre de 4 à 20 mg et de 50 et 200 mg respectivement.

2-2- Préparation à l'aide du protocole easyprep

La préparation d'ADN plasmidique (easyprep) est réalisée selon le protocole décrit (Berghammer et Auer, 1993). À partir d'une culture liquide de bactéries, 1,5 ml de culture sont prélevés et centrifugés (10 000 g pendant 5 min) pour précipiter les cellules. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris avec 80 µl de tampon de lyse (100 µl de Tris-HCl 1 M, 20 µl d'EDTA 0,5 M, 1,5 g de sucrose 15%, 20 mg de lysozyme, 2 mg de RNase pancréatique, 1 mg d'albumine de sérum bovin et 9,9 ml d'eau Milli Q). Ce tampon de lyse est préalablement préparé, réparti en fractions aliquotes et stocké à -20°C. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante, puis à 100°C à sec pendant 1 min et refroidi immédiatement 2 min dans la glace. Le mélange est ensuite centrifugé 20 min à 13 000 g et environ 70 µl de surnageant contenant l'ADN plasmidique sont prélevés. L'ADN extrait servira de matrice (10 µl par digestion) pour subir des digestions enzymatiques.

3- Quantification de l'ADN

Pour quantifier l'ADN, la lecture est réalisée à des longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} permet d'estimer la pureté de l'échantillon et donne une indication sur la contamination éventuelle de la préparation (par exemple protéines, ARN). Un échantillon d'ADN pur a une valeur de DO_{260}/DO_{280} égal à 1,8. La DO à 260 nm permet le calcul de la concentration d'acide nucléique dans l'échantillon sachant qu'une unité de DO est égal à 50 mg/ml d'ADN.

4- Digestion des fragments d'ADN

Les enzymes de restrictions (Gibco BRL, BioLabs) sont utilisées selon les recommandations du fournisseur. Les digestions sont soit simples (une enzyme) soit doubles (deux enzymes). Pour les digestions simples, environ 1 µg d'ADN est incubé avec 2 µl de tampon (x10) de l'enzyme et 1 µl d'enzyme dans un volume final de 20 µl complété par de l'eau Milli Q. Pour les digestions doubles, environ 1 µg d'ADN est incubé avec 0,5 µl de chacune des deux enzymes avec 2 µl du tampon (x10) approprié pour les deux enzymes dans un volume final de 20 µl. Les incubations sont réalisées à 37°C dans un bain-marie pendant au moins 2 heures. Après les digestions, une fraction aliquote est séparée en électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer la taille des fragments.

Pour la digestion partielle, environ 10 µg d'ADN sont ajoutés avec 20 µl de tampon (x10) et d'eau Milli Q pour un volume final de 200 µl. Une fraction aliquote de 40 µl est ensuite additionnée de 2 µl d'enzyme. Ensuite, 20 µl de ce mélange sont transférés dans un nouveau tube et un même volume de la solution d'ADN est ajouté puis homogénéisé. De la même façon, une partie aliquote de 20 µl de l'homogénat est diluée une nouvelle fois avec un volume identique de la solution d'ADN et cette opération est réalisée plusieurs fois. Les tubes de dilution sont ensuite incubés à 37°C dans un bain-marie pendant exactement 1 heure. Afin de récupérer le fragment d'ADN spécifique, la totalité du volume de digestion est déposé dans les puits d'un grand gel et après une bonne séparation du fragment d'intérêt, l'ADN du gel d'agarose est extrait et purifié.

5- Protocoles PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier un fragment d'ADN spécifique. Dans ce travail, les réactions PCR sont réalisées avec un thermocycleur Gene Amp 2400 (Perkin Elmer) en utilisant le protocole suivant : 25 cycles de trois phases avec une phase de dénaturation (1 min, 94°C), une phase d'hybridation (45 s à la température de 55°C

sauf pour l'amplification du gène de l'IFamide ou la température utilisée a été 65°C) et une phase d'élongation (45 s, 72°C sauf pour amplifier le promoteur de l'IFamide, et l'ADNc de l'IFamide ou le temps d'élongation a été de 90 s). L'amplification est réalisée dans un mélange comprenant au maximum 1 mg d'ADN à amplifier, les amorces sens et antisens (1 mM), le tampon Taq (x10), de 1,5mM MgCl₂, les DNTPs (0,2 mM chacun) et la Taq DNA polymerase (2,5 unités, Perkin Elmer) pour un volume final de 50 µl. Le résultat est analysé en faisant migrer une fraction aliquote sur gel d'électrophorèse.

6- Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Les électrophorèses sont réalisées à température ambiante et à un voltage variable d'une migration à une autre (4 mV/cm pour des gels analytiques, 1 mV/cm pour des gels-préparatifs exigeant une très bonne séparation) dans une cuve horizontale. La concentration en agarose des gels (entre 0,7 et 2%) est choisie en fonction de la taille des différents fragments d'acides nucléiques à séparer. L'agarose est dissoute au micro-onde dans du tampon TAE (composé de Tris 40 mM, acétate 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) puis est rajouté, après refroidissement (environ 45°C), du bromure d'éthidium (0,4 mg/ml). Les échantillons sont mélangés avec 1 µl de tampon de charge (tampon 6X : eau contenant 15% de ficoll, 0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol) et sont déposés dans les puits. La taille des fragments d'ADN est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire.

7- Purification des fragments d'ADN

7-1- Extraction des acides nucléiques

L'échantillon contenant les acides nucléiques est extrait avec un volume égal d'un mélange de phénol, chloroforme, et isoamyl alcool (25/24/1). Le phénol permet de dénaturer les protéines, mais n'inhibe pas complètement l'activité des RNases, d'où l'emploi du chloroforme. Le mélange est mixé au vortex jusqu'à émulsion, puis subit une centrifugation (12 000 g, 5 min) pour séparer la phase organique, de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et un même volume de chloroforme est ajouté, pour enlever toute trace de phénol résiduelle. Après agitation et centrifugation (12 000 g, 5 min), la phase aqueuse est récupérée, puis l'ADN est précipité dans un mélange d'acétate d'ammonium 3 M, pH 5,2 (1/10 du volume de l'échantillon) et d'éthanol 100% glacé (2 fois le volume de l'échantillon). Le tube est maintenu dans la glace pendant 15 à 30 min pour permettre la précipitation de l'ADN. L'ADN est ensuite récupéré

par centrifugation (12000 g, 10 min, 0°C) et le culot est lavé 2 fois avec de l'éthanol 70% puis centrifugé de nouveau (12000 g, 2 min, 4°C). Le culot est séché, récupéré dans 50 ml de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 0,1 mM, pH 8) et stocké à - 20°C.

7-2- Purification des produits PCR

Les fragments d'ADN obtenus après PCR sont purifiés directement à l'aide du kit Wizard PCR (Promega). Les échantillons PCR sont mélangés à 100 µl d'un tampon de purification (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% triton X-100) puis à une résine qui fixe l'ADN. La résine et l'ADN sont déposés sur une mini-colonne puis lavés et séchés (13 000 g, 20 s) et l'ADN est élué avec 100 µl d'eau.

7-3- Purification et extraction de l'ADN du gel d'agarose

7-3-1- La purification des fragments d'ADN (400pb-5kb)

Après migration sur gel d'agarose, la purification est réalisée en utilisant un kit de purification d'ADN (Roche Biochemicals). Après migration sur gel et une bonne séparation des fragments d'ADN à isoler, le gel est visualisé aux UV. La partie gélifiée, contenant les fragments d'ADN à extraire, est découpée au scalpel. Les morceaux d'agarose sont placés dans des tubes et 300 µl de tampon de solubilisation (iodure de sodium NaI 6 M) pour 100 mg de gel, sont ajoutés, ainsi que 10 µl d'une solution contenant des billes de silice permettant l'adsorption de l'ADN. Les tubes sont incubés à 50-60°C pendant 10 min et sont agités doucement tous les 2 min jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Après centrifugation (10 000 g, 30 s) et élimination du surnageant, les billes liant l'ADN sont mis en suspension dans 500 µl d'une solution qui maintient l'adsorption des acides nucléiques aux billes. Le culot est lavé 2 fois avec une solution de lavage puis séché pendant 15 min à température ambiante. L'ADN est enfin élué avec 20-50 µl de tampon TE ou d'eau Milli Q.

7-3-2- La purification des fragments d'ADN (10pb-200pb)

La purification de petits fragments d'ADN après migration sur gel d'agarose est réalisée en utilisant le kit d'extraction et de purification d'ADN adéquat MERmaid SPIN (Bio 101) dont le protocole de purification est similaire.

8 - Clonage des produits PCR

Les clonages des différents fragments d'ADN obtenus après PCR ont été réalisés en utilisant le kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Ce vecteur plasmidique, déjà linéarisé par le fabricant, possède une thymidine (T) en 3' avec une topoisomérase liée de façon covalente de chaque côté du vecteur (Figure 6). Comme l'enzyme Taq DNA polymérase ajoute une deoxyadénosine (A) en 3' du produit PCR, la ligation de l'insert au vecteur est alors facilitée.

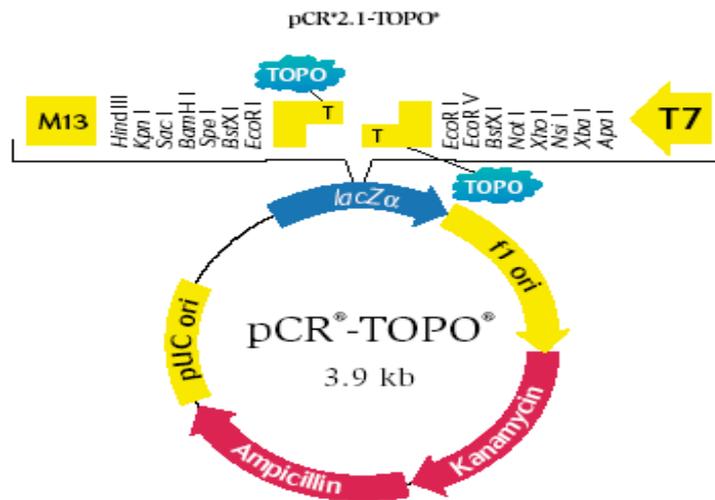


Figure 6 : Carte de restriction du vecteur de sélection pCR-TOPO (3,9 Kb) contenant le gène Lac Z permettant la sélection bleu/blanc des bactéries, les sites facilités de clonage et les gènes de résistance aux antibiotiques.

La réaction de clonage est réalisée en mélangeant 1 ml du produit PCR frais avec 1 ml de vecteur pCR2-1-TOPO et 3 ml d'eau Milli Q. Après incubation pendant 5 min à température ambiante, le mélange est centrifugé brièvement et déposé sur de la glace. Rapidement, on procède à une réaction de transformation en ajoutant 2 ml de réactif de clonage dans une fiole de cellules compétentes "One shot" fournies par le fabricant. Après agitation douce, le mélange est incubé pendant 30 min sur de la glace. Les cellules compétentes sont transformées avec le mélange de ligation par choc thermique (30 s à 42°C, puis 2 min dans la glace). Les bactéries sont ensuite reprises 250 ml dans du milieu "SOC" et le tube est agité 30 min à 37°C. Le milieu est composé de 2 g de peptone, 0,5 g d'extrait de levure, 50 mg de NaCl, 1 ml de KCl 250 mM pour un volume final de 100 ml. Après avoir mélangé et autoclavé le milieu, 500 ml de MgCl₂ 2M et 2 ml de glucose 1M sont finalement ajoutés. Une fraction aliquote de 10 à 50 ml est étalée sur des boîtes de LB/agar contenant de l'ampicilline (100 mg/ml) et du X-gal (40 mg/ml). Les boîtes sont incubées toute la nuit à 37°C.

La séquence codante de l'enzyme b-galactosidase (gène LacZ) est placée à cheval sur les sites de clonage. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré à ce niveau, les bactéries synthétisent une b-galactosidase altérée et généralement inactive. L'activité de cette enzyme est révélée *in vivo* en remplaçant le substrat naturel de l'enzyme (galactose) par du X-gal (5 bromo-4chloro-3indolyl-b-D-galactopyranoside). En ajoutant du X-gal au milieu de culture, on peut visualiser les bactéries possédant une galactosidase fonctionnelle car ces colonies se colorent en bleu. Ainsi, les colonies blanches sont constituées de bactéries transformées, dont le plasmide contient un insert qui empêche l'expression de la b-galactosidase d'être fonctionnelle. Les colonies bleues correspondent à des bactéries transformées, dont le plasmide ne contient théoriquement pas d'insert. Cependant, il est possible que les colonies bleues puissent posséder un insert de petite taille, et qui n'interfère pas le cadre de lecture du gène Lac Z. Ceci se remarque souvent quand le nombre de colonies blanches est faible par rapport au nombre de colonies bleues.

Les clones recombinants, sélectionnés par leur couleur, sont repiqués sur des boîtes de milieu sélectif d'une part et mis en culture LB liquide d'autre part. L'ADN plasmidique a été purifié et la taille ainsi que l'orientation de l'insert est vérifiée soit par coupure en utilisant différentes enzymes de restriction, situées sur le plasmide de part et d'autre du fragment cloné, soit par amplification PCR avec les amorces adéquates. À l'issue de ces différents tests, les plasmides ayant répondu positivement sont préparés en quantité suffisante pour séquençage.

9- Insertion de l'ADN par ligation

Un ratio entre l'insert et le vecteur d'expression de 2:1 a été utilisé. La ligation est réalisée en présence du vecteur digéré, de l'insert, 1 µl de T4 DNA ligase (Gibco BRL), 1 µl d'ATP 1 mM final, 4 µl de tampon de ligation (x5) et complétée avec de l'eau Milli Q pour un volume final de 20 µl. La réaction est effectuée pendant toute la nuit à 16°C. Une partie aliquote de la réaction de ligation est ensuite utilisée pour transformer des bactéries compétentes. Les clones bactériens obtenus sont mis en culture et l'ADN plasmidique est purifié et digéré pour vérification.

Afin d'éviter au vecteur de se "refermer" pendant la réaction de ligation, une étape de déphosphorylation est réalisée. Cette réaction est réalisée en même temps que la digestion du vecteur dans le tampon de digestion par ajout de 1 µl d'enzyme de phosphatase alcaline d'intestin bovin (Gibco BRL). Après incubation pendant 5 min à 37°C, l'enzyme est inactivée

15 min à 65°C. L'échantillon est ensuite chargé sur un gel d'agarose à 0,7% et la migration est effectuée pendant 1 heure à 60 V. La bande de taille attendue contenant le vecteur d'expression déphosphorylé est extraite et l'ADN purifié.

10- Production de bactéries compétentes

Des bactéries (*E. coli* souche DH5 α) sont cultivées toute une nuit en milieu liquide sans antibiotique. Le lendemain, 300 ml de milieu LB sontensemencés avec 1 ml de culture de la veille à 37°C, sous agitation jusqu'à obtention d'une densité optique de 0,3 à 600 nm. Les bactéries sont ensuite précipitées par centrifugation (4 000 g, 15 min à 4°C). Le surnageant est éliminé et, le culot repris dans 100 ml de CaCl₂ à 50 mM, le mélange resuspendu est laissé sur la glace pendant 1 h à 4°C. Les bactéries sont recentrifugées 4 000 g pendant 15 min à 4°C et le culot est repris dans 10 ml de CaCl₂ à 50 mM. Un volume de 1,9 ml du glycérol stérile à 80% (concentration finale de 15%) est ajouté puis les bactéries sont rapidement réparties en fractions aliquotes à raison de 50 μ l par tube, puis congelées à - 80°C dans des boîtes Nalgène qui permettent une congélation progressive des cellules.

11- Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries compétentes sont décongelées dans de la glace. Un volume de 1 à 2 μ l du produit de ligation (50 à 500 ng d'ADN) sont ajoutés aux 50 μ l de bactéries compétentes et laissées 30 min à 4°C dans la glace. Au bout de 30 min, un choc thermique est réalisé (45 s à 42°C) et les bactéries sont laissées 5 min dans la glace, puis 500 μ l de milieu LB sans antibiotique sont ajoutées. Le mélange est incubé 1 h à 37°C sous agitation constante. Des volumes de 10 et 50 μ l de bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant l'ampicilline et les boîtes sont enfin déposées dans une étuve à 37°C pour la nuit. Le lendemain, les colonies sont repiquées en milieu solide et amplifiées en milieu liquide, puis stockées sous forme glycérolée (15%) à - 80°C.

12- Séquençage d'ADN

Le séquençage a été réalisé par des entreprises commerciales (Eurogentec, Seraing, Belgique ; Génome express, Toulouse). Les séquences, ainsi obtenues, ont été utilisées pour des recherches TBLASTN dans Genbank et Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) dans Flybase qui est l'encyclopédie électronique du génome de la drosophile (<http://www.fruitfly.org/>, 1999).

13 - Titration de la banque de bactériophage lambda gt11

Le criblage de la banque d'expression a été réalisé sur une banque d'ADNc de tête de drosophile dont les fragments d'ADN ont été clonés au site Eco R1 du bactériophage λ gt11. Le titrage de banque de bactériophage permet de connaître le nombre de phages présents dans la solution. Pour déterminer de façon précise le titre de la banque mère, différentes dilutions sont réalisées pour obtenir des boîtes dans lesquelles la densité des plages de lyse peut être déterminée avec précision. À cette fin, une fraction aliquote de la banque est mélangée à 100 ml de tampon SM (NaCl 0,1 M, MgSO₄·7H₂O 8 mM, Tris-HCl pH 7,5 50 mM, 2% gélatine) et 500 ml de bactéries E.Coli Y10-90. Le mélange est incubé 20 min à 37°C puis 3 ml de top-agar est ajouté, à une température de 56°C. Le mélange est immédiatement étalé sur une boîte de Pétri contenant du LB/agar et incubé toute la nuit à 37°C. Le lendemain, le nombre de plages de lyse de la boîte est compté.

14 - Amplification de la banque

Afin d'avoir une quantité suffisante d'ADN de phages pour travailler on amplifie la banque, c'est-à-dire que le nombre de phages est multiplié. Des boîtes de plages de lyse sont obtenues de la même façon que pour une titration puis celles-ci sont recouvertes de tampon SM (15 ml) et mises sous agitation lente pendant 2 à 16 heures à 4°C. Le tampon SM dans lequel ont diffusé les phages est récupéré et centrifugé (10 000 g, 15 min, 4°C) pour éliminer l'agar. La banque, ainsi amplifiée, est stockée à 4°C après ajout de chloroforme (5%).

15 - Criblage de la banque d'expression

15-1- Par la technique de PCR

La banque a été criblée par PCR en utilisant des amorces spécifiques de l'ADNc recherché (amorces IFa-1, IFa-2 et IFa-3).

| | | |
|--------------|----------------------------|----------|
| IFa-1 | 5'-ACTGCAAGATGGCTCTTCG-3' | Tm=56 °C |
| IFa-2 | 5'-CTGTCGTTCTGGGGAAACC-3' | Tm=58 °C |
| IFa-3 | 5'-CGGCATTTCCACATTCAGTC-3' | Tm=68 °C |

Une fraction aliquote de la banque est étalée sur une boîte de la même façon que pour l'amplification de la banque. Le lendemain, les plages de lyse sont comptées et la boîte est coupée en 16 parts égales, le top agar correspondant à chaque part est récupéré, à l'aide d'une spatule stérile, et mis dans 1 ml de tampon SM. Après 30 min d'incubation à température

ambiante, les phages qui ont diffusé dans le tampon sont repris dans un tube stérile en présence de chloroforme (5%). Une fraction aliquote de 200 µl de chaque tube est prélevée pour extraire l'ADN, qui est purifié au phénol chloroforme. L'ADN des 16 tubes ainsi obtenus est testé par PCR. Un des tubes qui a donné une bande de taille attendue après PCR est alors titré. Puis on réitère la procédure en réalisant des boîtes de plages de lyse comprenant deux fois le nombre de phages contenus initialement dans le quartier 1/16. Ces boîtes sont à leur tour coupées en 16 parts et le protocole précédemment décrit est répété plusieurs fois. Pour écarter des problèmes de contamination par PCR, nous avons généré une sonde marquée pour continuer le criblage de la sous-banque d'expression obtenue (environ 625 clones) contenant l'ADNc recherché.

15-2- Par une sonde ADN-DIG

Le criblage de la banque d'ADNc est réalisé par hybridation avec une sonde d'ADNc marquée à la digoxigénine et des plages de lyse transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les plages de lyses positives sont visualisées et localisées par révélation de coloration antigène - anticorps.

15-2-1- Marquage de la sonde ADN

La sonde ADN est obtenue par PCR en utilisant le système DIG-High prime (Roche Biochemicals). La digoxigénine (DIG) est un haptène stéroïde lié aux dUTP. Lors de la synthèse de la sonde, cette base modifiée va s'incorporer à l'ADN et sera par la suite détectée. Le plasmide (1 mg d'ADN, préalablement linéarisé, contenant l'insert à amplifier) est ajouté à un mélange contenant les amorces IFa-1 et IFa-2 (1 mM chacun), le tampon PCR contenant du MgCl₂ (2,5 mM), les dNTPs (0,2 mM) incluant la Digoxigénine-11-dUTP et la Taq DNA polymérase (2,5 unités, Perkin Elmer) pour un volume final de 50 µl. La sonde marquée est ensuite quantifiée et la quantité de sonde requise pour la technique d'hybridation sur membrane se situe entre 5 à 25 ng/µl.

15-2-2- Transfert sur membrane

Les boîtes contenant les plages de lyse sont recouvertes pendant 5 min d'une membrane de nitrocellulose Gelman Sciences (Bio Trace 82 mm, 0,45 mm) pour permettre le transfert d'ADN par capillarité. Les membranes sont successivement trempées dans une solution de dénaturation (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M) et de neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1 M, pH

7,2). Après rinçage dans un bain de SSC 2 X (SSC 20 X : NaCl 3 M, Citrate de sodium 0,3 M, pH 7), l'ADN est lié irréversiblement à la membrane, par irradiation aux ultraviolets (à raison de 0,12 J/cm²).

15-2-3- Hybridation

Les membranes sont préhybridées 1 h à 68°C dans le tampon de préhybridation (SSC 5 X, SDS 0,02%, N-lauroylsarcosine 0,1%, solution de blocage 10% et 100 mg/ml d'ADN de sperme de saumon) puis incubées à 68°C une nuit, avec la sonde à 25 ng/ml, préalablement dénaturée. Après l'hybridation, les membranes sont lavées 2 fois 5 min dans du tampon 2X SSC contenant 0,1% de SDS, puis 2 fois 15 min à 68°C dans du 0,01% SSC contenant 0,1% de SDS. Les membranes sont ensuite équilibrées 5 min dans un tampon de lavage (tampon d'acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, 0,3% Tween 20) puis elles sont incubées 30 min dans la solution de saturation (la solution stock de blocage est diluée au 1/10 dans le tampon d'acide maléique). La présence de la sonde est révélée, en incubant les membranes pendant 30 min avec l'anticorps anti-DIG fourni par le fabricant (dilution 1/5000) couplé à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline réagit avec le substrat de coloration. Après 2 lavages de 15 min avec la solution de lavage, les membranes sont équilibrées pendant 5 min dans le tampon de détection (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM) puis recouvertes par le substrat de coloration composé de 5 ml de tampon de détection contenant 22,5 ml de 4-Nitro Blue Tetrazolium (NBT, 75 mg/ml dans du DMF) et 17,5 ml de 5-bromo-4-chloro-3 indolyl-phosphate (BCIP ou X-phosphate, 50 mg/ml dans l'eau) et les membranes sont incubées à l'obscurité. Après visualisation des phages positifs, la réaction de coloration est arrêtée en lavant les membranes pendant 5 min avec de l'eau. Les plages de lyse, positivement marquées, sont alors testées individuellement par PCR et récupérées dans 500 µl de SM et 50 µl de chloroforme.

16- Hybridation *in situ* sur cerveaux de larves et adultes

16-1- Marquage de la sonde ARN-DIG antisens

Préalablement au marquage, le plasmide pCR-IFamide (section 17) utilisé comme matrice est linéarisé par l'enzyme de restriction Bam HI, puis l'ADN est purifié au phénol chloroforme et précipité à l'éthanol absolu. La sonde ARN marquée à la digoxigénine est réalisée grâce au kit DIG RNA Labelling (Roche Biochemicals). Le plasmide (1 mg d'ADN) est ajouté à un mélange constitué de 4 µl de NTP-DIGMix (ATP et GTP à 10 mM, UTP à 6,5

mM et DIG-UTP 3,5 mM, pH 7,5), de 4 ml de tampon de transcription 10x, de 2 ml d'inhibiteur de RNase, de 4 ml de T7 RNA Polymérase et complété avec de l'eau traité au diéthylpyrocarbonate (DEPC) pour un volume final de 40 µl. Le mélange est incubé pendant 2 h à 37°C, puis 2 ml de DNase I, RNase "free" est ajouté et l'incubation est prolongée de 20 min à 37°C. A cette étape, une fraction aliquote de 1 µl de la sonde est prélevée pour subir une migration sur gel d'électrophorèse et 1 µl est utilisé pour quantifier la sonde suivant le protocole décrit dans le kit Roche Biochemicals. Ensuite, un volume de 9 ml d'H₂O DEPC est ajouté puis la sonde subit une lyse alcaline. Pour cela, un volume de 50 ml de tampon carbonate X2 (Na₂CO₃ 120 mM, NaHCO₃ 80 mM, pH 10,2) est ajouté à la sonde et laissé incubé pendant 20 min à 65°C. La lyse est ensuite stoppée avec 100 ml d'acétate de sodium 0,2 M pH 6 et le mélange est complété de 30 ml de LiCl 4 M et de 600 ml d'éthanol absolu puis incubé une nuit à - 80°C. Le lendemain, le tube est centrifugé pendant 15 min à 13 000 g à 4°C, puis le culot est lavé avec 400 µl de d'éthanol 70% dans l'eau traité au DEPC. Le tube subit une centrifugation pendant 10 min à 4°C et le culot est séché 10 min à 37°C repris dans 20 ml de tampon d'hybridation (TH) constitué de 5 ml formamide, 2,5 ml SSC 20X, 10 ml d'héparine 100 mg/ml, 100 ml d'ADN de sperme de saumon à 10 mg/ml préalablement dénaturé pendant 5 min à 100°C, 10 ml de Tween 20 et 2,38 ml H₂O traité au DEPC. La sonde est finalement dénaturée par incubation pendant 3 min à 100°C puis immédiatement refroidie dans la glace et prête à l'emploi.

16-2 - Traitement des cerveaux à la protéinase K

Après prélèvement des cerveaux de larves et/ou d'adultes, les tissus sont fixés pendant 25 min dans 5% formaldéhyde dans PBT (NaH₂PO₄, 2H₂O 20 mM, NaCl 130 mM, pH 7,2 et 0,2% Tween 20). Les cerveaux sont lavés deux fois pendant 10 min dans du PBT. Après la fixation, les tissus sont lavés par deux bains de PBT pendant 10 min. À cette étape, les cerveaux peuvent subir une déshydratation par des bains successifs pendant 5 min de 10%, 25%, 50%, 75%, 100% d'une solution de méthanol/EDTA (10% EDTA 0,5M) dans du PBT pour être stockés pendant plusieurs mois à -20°C. Avant l'incubation avec la protéinase K (PK), les tissus sont réhydratés par des bains successifs pendant 5 min de 100%, 75%, 50%, 25% d'une solution de méthanol dans du PBT suivi par deux lavages pendant 3 min de PBT. Les cerveaux de larves et d'adultes sont incubés respectivement pendant 10 et 7 min à 37°C sous agitation douce dans 1 ml de PBT contenant 4 mg/ml de protéinase K (ajouter 2 ml de PK d'une solution stock à 20 mg/ml dans 10 ml de PBT, mélanger puis déposer 1 ml dans le tube

contenant les cerveaux). La digestion est arrêtée par deux lavages de 1 ml de glycine 0,2% sous agitation douce, suivie d'un lavage pendant 5 min avec du PBT. Les tissus subissent une autre fixation pendant 25 min dans 5% formaldéhyde dans PBT. Après l'incubation dans le fixateur, les cerveaux sont lavés successivement 5 fois dans le PBT pendant 5 min, puis 1 fois avec une solution contenant 500 ml PBT et 500 ml de TH pendant 10 min et 3 fois avec du TH.

16-3- Hybridation

Les cerveaux sont pré-hybridés dans 1 ml de TH pendant 1 h à 55°C sans agitation. Après élimination de la quasi-totalité du TH, les cerveaux sont incubés toute la nuit à 55°C sans agitation avec 30 ml de sonde ARN sens ou antisens à 25-50 ng/ml dans du TH. La sonde est préalablement dénaturée en la chauffant pendant 5 min à 100°C puis refroidie 5 min dans la glace. Le lendemain, la sonde est récupérée et stockée à -20 °C pour une utilisation ultérieure. Les cerveaux sont lavés successivement 4 fois dans 1 ml de TH pendant 15 min à 55 °C, puis une fois dans 1 ml d'une solution de 500 ml TH et 500 ml de PBT pendant 10 min à température ambiante et 4 fois dans 1 ml de PBT pendant 5 min. Les tissus sont ensuite incubés sous agitation pendant 2 h à température ambiante avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline à la dilution finale 1/2000 (Roche Biochemicals). Cet anticorps a été préalablement pré-adsorbé toute la nuit à 4°C à une dilution de 1/10 sur des cerveaux traités de la même façon que les autres mais juste avant l'ajout de TH, puis stocké dans 1 ml de PBT (dilution 1/500). Après 4 lavages dans le PBT pendant 15 min et 3 lavages avec le tampon phosphatase alcaline TPA (NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris-Hcl 100 mM, pH 9,5, Tween 20 0,1%), les tissus sont incubés sous agitation et à l'abri de la lumière avec le substrat de coloration (4,5 ml de NBT sont mélangés avec 3,5 ml de BCIP à 1 ml de TPA). Dès apparition d'une coloration (environ 15 à 30 min), la réaction est arrêtée en réalisant trois lavages avec de l'éthanol 95% dans H₂O traité au DEPC pendant 5 min. Ensuite, des bains successifs de 20%, 50%, 80% de glycérol dans le PBS sont réalisés et les cerveaux sont laissés à incuber toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les cerveaux sont montés entre lame et lamelle pour observation au microscope.

17- Constructions des plasmides

17-1- Construction de pP{UAS- Gène IFamide}

La séquence génomique codant le précurseur de l'IFamide, a été amplifiée par la technique de PCR avec l'amorce sens ADN-1, additionnée d'un site Eco RI, et antisens ADN-

2, additionnée d'un site Xba I, en utilisant l'ADN génomique comme matrice ; ces amorces sont basées sur les séquences génomiques de BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project).

| | | |
|---------------|--|----------------------|
| Eco RI | | |
| ADN-1 | 5'-GCGAATTCTTCCTTTCCTTTCCTGCCCACAAC-3' | T _m =71°C |
| ADN-2 | 5'-GCTCTAGAAAGCAGGAGAGCGAGTTCAG-3' | T _m =72°C |
| Xba I | | |

Un fragment de 563 pb correspondant à la séquence du gène de l'IFamide a été obtenu et cloné dans le vecteur pCR-TOPO pour donner le vecteur pCR-IFamide. Après vérification de la séquence, le plasmide a été digéré par les enzymes Eco RI et Xba I et le fragment contenant la séquence codante pour l'IFamide, extrait du gel d'agarose, a été inséré par ligation dans le vecteur pP{UAST} préalablement digéré par les enzymes Eco RI et Xba I. Le vecteur pP{UAST} (environ 9050 pb) est un vecteur de clonage permettant l'expression d'un gène sous contrôle du facteur de transcription de levure GAL4. Le vecteur pP{UAST} possède la séquence UAS_G répétée 5 fois, suivie de la séquence promotrice minimale de la protéine de choc thermique Hsp70 et la séquence TATA box, qui correspond au site du début de transcription. Après le site de clonage multiple où le gène peut être inséré, on trouve la séquence de polyadénylation et le petit intron de SV40.

17-2- Construction de pP{promIFa-GAL4}

Le promoteur potentiel du gène de l'IFamide a été obtenu en amplifiant 1,5 kpb de la séquence génomique en amont du site d'initiation de la traduction de l'ARNm de l'IFamide avec les amorces sens PM-1 et antisens PM-2 et en clonant le produit PCR dans le vecteur pCR-TOPO, ce qui a donné le vecteur pCR-promIFa. Les amorces PM-1 et PM-2 sont basées sur les séquences génomiques et les amorces PM-1 et PM-2 sont additionnées respectivement d'un site Mfe I et Bgl II pour faciliter le clonage.

| | | |
|---------------|------------------------------------|----------------------|
| Mfe I | | |
| PM-1 | 5'-GCCAATTGGCTGAATCTCCTGACCCTCA-3' | T _m =79°C |
| PM-2 | 5'-GCAGATCTCTTGCAGTTTTTCGGTGAGC-3' | T _m =78°C |
| Bgl II | | |

La construction du plasmide pP{promIFa-GAL4} a été réalisée en échangeant le promoteur potentiel du gène de la corazonine par celui du gène de l'IFamide dans le vecteur

pP{CRZN-GAL4} (don du Dr. Guillaume Isabel). Le vecteur pP{CRZN-GAL4} est digéré par Eco RI et Bam HI (le pP{CRZN-GAL4} contient un seul site Eco RI et un seul site Bam HI et entre ces deux sites se trouve le promoteur du gène de la corazonine) et le pCR-promIFa est digéré complètement avec Bgl II (compatible avec Bam HI) et partiellement avec Eco RI (il y a un site Eco RI au milieu du promoteur potentiel du gène de l'IFamide). Après purification des fragments ADN du gel d'agarose, nous avons produit le pP{promIFa-GAL4} par ligation de ces deux fragments. Le vecteur pP{CRZN-GAL4} a été produit à partir de pGaTB (Brand & Perriomon, 1993) et pP{CaSpeR} (Thummel et al., 1988) et le promoteur potentiel du gène de la corazonine (Isabel, communication personnelle) ; il permet l'incorporation d'un élément P dans le génome de la drosophile contenant le gène mini *white* et une séquence d'ADN codante pour le GAL4 sous contrôle du promoteur du gène de la corazonine. Le vecteur de clonage pGaTB (environ 6120 pb) est la source du fragment Hsp70 Bb-GAL4 et le vecteur pP(CaSpeR) (environ 7776 pb) celle du gène mini *white* (le marqueur phénotypique de sélection de transformants).

17-3- Construction de pP{UAS-GAN} (GAN : Gène Artificiel de Neuropeptide)

Pour que ce gène artificiel soit exprimé dans des cellules de *Drosophila melanogaster*, il faut que l'élaboration de la séquence génétique soit compatible avec les différents processus cellulaires (transcription, traduction, et les différentes modifications enzymatiques) aboutissant à l'expression d'un peptide artificiel mature.

17-3-1 Usage biaisé des codons

Étant donné que le code génétique est dégénéré, plusieurs codons peuvent coder un même d'acide aminé. L'usage biaisé des codons correspond à l'utilisation inégale des codons synonymes qui est en relation avec la disponibilité des ARN de transfert (ARNt) et du taux de synthèse protéique. Il a été montré que les codons les plus fréquemment utilisés sont ceux qui sont traduits par les ARNt les plus abondants (Powell et Moriyama, 1997). Les quantités d'ARNt changent quantitativement et qualitativement (par exemple dans différents types de cellules ou tissus) durant le développement de la drosophile (Moriyama et Powell, 1997). Nous avons donc choisi les codons les plus fréquemment utilisés à l'état adulte pour construire la séquence du gène artificiel de neuropeptide (Tableau 2). Nous avons pu confirmer la fréquence d'utilisation de ces codons dans les séquences génomiques codant différents neuropeptides chez la drosophile.

| Nomenclatures des résidus d'acidesaminés | | | Codons Utilisés | Codons majeurs des ARNt |
|--|-----|---|-----------------|-------------------------|
| Valine | Val | V | GTG | GTG |
| Proline | Pro | P | CCC | CCA |
| Thréonine | Thr | T | ACC | ACC, ACA |
| Alanine | Ala | A | GCC | GCC |
| Glycine | Gly | G | GGC | GGC |
| Leucine | Leu | L | CTG | CTG |
| Serine | Ser | S | TCC | TCC |
| Arginine | Arg | R | CGC | CGC |
| Isoleucine | Ile | I | ATC | ATC |
| Phénylalanine | Phe | F | TTC | TTC |
| Tyrosine | Tyr | Y | TAC | TAC |
| Histidine | His | K | CAC | CAC |
| Asparagine | Asn | N | AAC | AAC |
| Aspartate | Asp | D | GAC/GAT | GAT, GAC |
| Cystéine | Cys | C | TGC | aucun |
| Glutamine | Gln | Q | CAG | aucun |
| Lysine | Lys | K | AAG | AAG |
| Glutamate | Glu | E | GAG | GAA, GAG |
| Méthionine | Met | M | ATG | - |
| Tryptophane | Trp | W | TGG | - |

Tableau 2 : Représentation de l'usage préférentiel des codons correspondant pour chaque acide aminé. Les acides aminés qui utilisent une cytosine ou une thymidine / cytosine en troisième position du codon utilisent les codons finissant par une cytosine. La valine et la leucine sont des exceptions dans le sens où elles utilisent des codons finissant par la guanine. Tous les acides aminés finissant par une adénine / guanine préfèrent les codons finissant par la guanine. L'Aspartate ne montre aucune différence consistante pour les codons GAC ou GAT et la cystéine et la glutamine ne montrent aucune différence dans la disponibilité en ARNt donc dans l'usage des codons. La méthionine et le tryptophane sont exclus car ce sont des acides aminés non dégénérés par rapport aux 18 autres acides aminés (Powell et Moriyama, 1997).

Nous avons réalisé la construction d'un gène artificiel codant un précurseur de neuropeptide. Ce gène artificiel a été constitué en deux étapes de la façon suivante :

17-3-2- Construction de pCR-SP (SP : Signal Peptide)

La première construction comprend la séquence du peptide signal et la séquence consensus du site d'initiation de la traduction chez les eucaryotes appelée site de Kozak. Ce dernier comprend six nucléotides qui précèdent le codon d'initiation ATG et le nucléotide qui le suit. Chez les vertébrés, la séquence de Kozak est importante pour une bonne traduction de l'ARNm et sa séquence consensus est la suivante : C/A-A-A-A/C-**ATG**-G (Kozak 1987 ; Cavener 1987). Étant donné qu'il n'est pas sûr que la séquence du site de Kozak soit aussi importante chez les insectes que chez les vertébrés et que les séquences des peptides signaux

obéissent également aux mêmes règles que les peptides signaux d'autres organismes, nous avons choisi de prendre le peptide signal et le site de Kozak de la corazonine (Veenstra, 1994).

Le peptide signal de la corazonine a été amplifié en utilisant les amorces sens PS-1 et antisens PS-2 et le plasmide pC6 contenant le gène de la corazonine (Veenstra, 1994) comme matrice. L'amorce PS-1 contient le site de restriction Eco RI et le site de Kozak tandis que l'amorce PS-2 possède le site Bgl II.

| | Xho I | Eco RI | Site de Kozak | |
|-------------|---|---------------|----------------------|---------|
| PS-1 | 5'- CGCCTCGAGGAATTCTGCCGAAACATGTTGCGC -3' | | | Tm=78°C |
| PS-2 | 5'- GGAGATCTCCTGGCCCATGCACATGGA -3' | | | Tm=72°C |
| | Bgl II | | | |

Le produit obtenu par PCR a été cloné dans le vecteur pCR-TOPO et la séquence du plasmide obtenu (pCR-SP) est confirmée par séquençage.

17-3-3- Construction de pCR-PP1 et pCR-PP2 (PP : propeptide)

La deuxième construction, qui comprend les séquences codantes du propeptide, peut générer deux neuropeptides, l'IFamide et un neuropeptide artificiel dont les quatre derniers acides aminés sont identiques à ceux de l'endomorphine-1 de vertébrés. Ce deuxième peptide, que nous avons appelé la drosoendomorphine, devrait permettre de distinguer l'expression de GAN de celle du précurseur authentique de l'IFamide. Chacun de ces neuropeptides dans le précurseur est suivi par un acide aminé Gly, pour assurer son amidation C-terminale et par le site consensus de clivage de convertase Lys-Arg. La séquence du précurseur se termine avec la séquence du site de terminaison de la traduction dont la séquence consensus est la suivante : AAG-TAA-G (Cavener and Ray 1991). Le premier neuropeptide du propeptide possède également en amont une séquence Lys-Arg. Des deux côtés de la séquence ADN, nous avons ajouté des sites de restriction pour permettre l'assemblage du gène entier (à l'extrémité 5' Bgl II et à l'extrémité 3' Xba I).

Le plasmide pCR-PP1 (qui code une copie de l'IFamide et deux copies de la drosoendomorphine) a été produit avec les oligonucléotides suivants :

Bgl II

| | | |
|-------------|---|----------|
| P-1 | 5'-GGGGAGATCTCCAAGCGCGACGACGC-3' | Tm=74 °C |
| P-2 | 5'-CGAGGAGGACGACTACCCCTGGTTCGGCAAG-3' | Tm=77 °C |
| P-3 | 5'-CGCGCCTACCGCAAGCCCCCTTCAAC-3' | Tm=75 °C |
| P-4 | 5'-GGCTCCATCTTCGGCAAGCGCGACGACGC-3' | Tm=77 °C |
| P-5 | 5'-TAGTCGTCTCCTCGGCGTCGTCGCGCTTG-3' | Tm=77 °C |
| P-6 | 5'-TGCGGTAGGCGCGCTTGCCGAACCAGGGG-3' | Tm=77 °C |
| P-7 | 5'-CCGAAGATGGAGCCGTTGAAGGGGGGCT-3' | Tm=75 °C |
| P-8 | 5'-CGGTCTAGAGGCTTACTTGCGCTTGCCGAACCAGGGG-3' | Tm=82 °C |
| P-1* | 5'-GGGGAGATCTCCAAGCGCGAC-3' | Tm=65 °C |
| P-8* | 5'-CGGTCTAGAGGCTTACTTGC-3' | Tm=59 °C |

Xba I

Les amorces ont été hybridées par paires (P-1/P-5, P-2/P-6, P-3/P-7, P-4/P-5 et P-2/P-8) dans des tubes individuels en ajoutant 100 pmoles des deux amorces respectives avec 5 ml de tampon ligase (x5), 1 ml de dNTPs et d'H₂O pour un volume final de 50 ml. Ces tubes sont placés dans un bain marie à 96°C puis laissés à refroidir lentement (1 h) jusqu'à obtention d'une température proche de 20°C. Les paires d'amorces sont ensuite mélangées avec un ratio molaire 1:1:1:1 et la réaction de ligation est réalisée, à température ambiante pendant au moins 2 h, en ajoutant un volume de 2,5 ml de ligase au mélange. Enfin, 1ml de Taq DNA polymérase est ajouté au produit de ligation suivi d'une incubation pendant 20 min à 72°C pour obtenir un fragment d'ADN double brin par polymérisation aux deux extrémités. Une fraction aliquote de ce produit est amplifiée en utilisant les amorces P-1* et P-8* avec le programme suivant : 30 cycles, 60 s de dénaturation à 96°C, 45 s d'extension à 72°C, 60 s d'hybridation à 40°C. Un produit de 165 pb a été obtenu et a été cloné au pCR-TOPO pour donner pCR-PP1, dont la séquence a été confirmée par séquençage. Initialement, nous attendions le clonage d'autres fragments d'ADN de taille plus importante. En effet, la réaction de ligation aurait pu produire des séquences beaucoup plus longues (notamment lorsque nous avons utilisé des quantités de paires d'amorces P-1/P-5 et P-2/P-8 beaucoup moins importantes que les autres paires), mais nous n'avons pas pu cloner de telles séquences.

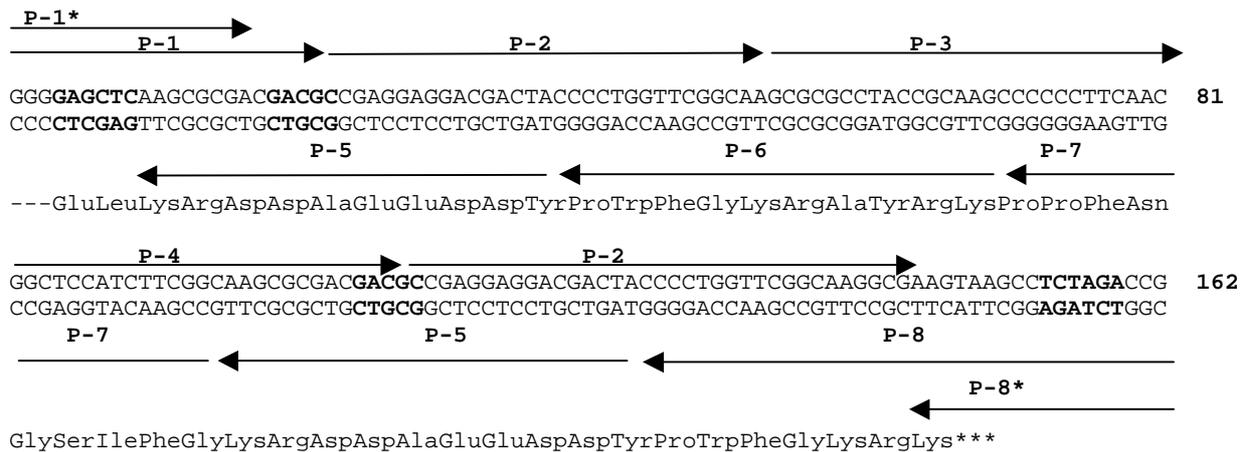


Figure 7 : Séquence du propeptide indiqué par la position des différents oligonucléotides. En gras, les sites de restriction utilisés pour le clonage, Bgl II et Xba I et Hga I qui ont été utilisés pour produire un propeptide plus grand.

Nous avons été donc obligés d'utiliser une autre stratégie pour augmenter le nombre de copies de neuropeptides dans le propeptide, en utilisant l'enzyme de restriction Hga I. La séquence excisée comprend celle codante de l'IFamide et celle codante de la drosoendomorphine. Le but est de produire un assemblage de plusieurs copies de cette séquence. Pour cela, l'ADN plasmidique contenant une copie du gène artificiel (pCR-PP1) est extrait et digéré par l'enzyme Eco RI et subit une amplification par PCR avec les amorces P-1* et P-8* comme décrit en haut, afin d'obtenir de grandes quantités de gène artificiel. L'ADN est ensuite purifié au phénol chloroforme puis digéré par l'enzyme Hga I. Cette digestion produit trois types de fragments d'ADN (A-B-C) et le but était d'obtenir des combinaisons suivantes A-B(n)-C. Nous avons extrait le fragment B de 87 pb du gel avec le kit adéquat et nous avons réalisé une réaction de ligation de ce fragment B avec le produit de digestion précédemment obtenu suivie d'une amplification par PCR avec les amorces P-1* et P-8*. Après migration sur gel d'agarose, nous avons uniquement obtenu des bandes correspondant à des tailles de 165 (1 copie), de 250 (2 copies). Nous avons subcloné le produit PCR correspondant à 2 copies du gène artificiel dans le vecteur pCR-TOPO et la séquence du plasmide obtenu (pCR-PP2) est confirmée par séquençage.

| | |
|---|-----------|
| <u>GAATTCTGCCGAAACATGTTGCGCCTCCTGCTGCTGCCCTCTTCTCTTCACGCTCTCCATGTGCATG</u> | 69 |
| MetLeuArgLeuLeuLeuLeuProLeuPheLeuPheThrLeuSerMetCysMet | 18 |
| | |
| <u>GGCCAGGAGCTCAAGCGCGACGACGCCGAGGAGGACGACTACCCCTGGTTCGGCAAGCGCGCTACCGC</u> | 138 |
| GlyGlnGluLeuLysArgAspAspAlaGluGluAspAspTyrProTrpPheGlyLysArgAlaTyrArg | 41 |
| S | |
| <u>AAGCCCCCTTCAACGGCTCCATCTTCGGCAAGCGCGACGACGCCGAGGAGGACGACTACCCCTGGTTC</u> | 207 |
| LysProProPheAsnGlySerIlePheGlyLysArgAspAspAlaGluGluAspAspTyrProTrpPhe | 64 |
| | |
| <u>GGCAAGGCGGCCTACCGCAAGCCCCCTTCAACGGCTCCATCTTCGGCAAGCGCGACGACGCCGAGGAG</u> | 276 |
| GlyLysArgAlaTyrArgLysProProPheAsnGlySerIlePheGlyLysArgAspAspAlaGluGlu | 87 |
| | |
| <u>GACGACTACCCATGGTTCGGCAAGGCGAAGTAAGCCTCTAGA</u> | 318 |
| AspAspTyrProTrpPheGlyLysArgLys*** | 91 |

Figure 8 : Séquence finale du gène artificiel de neuropeptide. Les séquences nucléotidiques soulignées indiquent les sites de restriction utilisés, EcoR I et Xba I pour le clonage du gène assemblé dans le vecteur pP{UAST}, Bgl II pour joindre le peptide signal avec le reste du précurseur et le site Hga I pour augmenter le nombre de copies de chacun des neuropeptides du précurseur. Les acides aminés doublement soulignés indiquent les sites de clivage des convertases, le résidu Gly en gras qui est normalement sensé être transformé en amide et le triangle indique le site de clivage du peptide signal prédit.

Ensuite, la construction de pP{UAST-PS/PP2} a été obtenue en digérant le pCR-PS avec les enzymes Eco RI et Bgl II, le pCR-PP2 avec les enzymes Bgl II et Xba I et les fragments PS et PP2 sont extraits du gel d'agarose. Ces deux fragments sont réunis par l'intermédiaire du site de restriction Bgl II puis finalement insérés par ligation dans le vecteur pP{UAST} qui a été préalablement digéré par les enzymes Eco RI et Xba I .

18- Révélation de l'expression du gène LacZ

Pour l'étude de la spécificité du promoteur de l'IFamide, nous avons effectué des colorations au X-Gal de système nerveux de larves de drosophiles issues du croisement de la lignée P{promIFa-Gal4} avec la lignée P{UAS-LacZ cytoplasmique}. La présence de l'élément P{LacZ} va induire l'expression du gène lacZ qui code l'enzyme b- galactosidase. Ainsi en présence de X-gal, les cellules dans lesquelles l'élément P est transcrit, sous la dépendance du promoteur à IFamide, seront colorées en bleu, ainsi que les axones car l'expression est cytoplasmique. Cette coloration sera comparée avec le marquage immunohistochimique préalablement obtenu avec l'anticorps anti-IFamide.

Les cerveaux de 3^{ème} stade larvaire sont disséqués dans du NaCl 9% et fixés dans un mélange PBS formaldéhyde 4% pendant 10 min. Le fixatif est remplacé par du PBS puis les tissus sont ensuite perméabilisés par une incubation dans du PBS triton 0.3% pendant 2 h. Ensuite, ils sont lavés une fois avec la solution de coloration sans X-Gal, puis laissés dans la

solution de coloration avec X-Gal à 37°C toute la nuit (la composition de la solution de coloration est la suivante : tampon phosphate pH 7,2 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, K₄(FeII(CN₆)) 3,1 mM, K₃(FeIII(CN₆)) 3,1 mM, X-Gal 1 mg/ml). La coloration est arrêtée par lavages au PBS triton 0.3%, puis les tissus sont observés à l'aide d'un montage sur lame dans du PBS sous microscope.

IV- METHODES DE TRANSFORMATIONS GENETIQUES

1- Transformation génétique

1-1- Principe de la micro-injection

Il s'agit d'injecter de l'ADN exogène de façon artificielle, dans une région proche des noyaux des futures cellules germinales de la drosophile pour qu'il s'y intègre (Spradling and Rubin, 1982). L'ADN doit être injecté dans des embryons âgés au maximum de 45 minutes (c'est-à-dire dans les premières étapes du développement de la drosophile dit syncitial) pour que l'ADN atteigne les noyaux puisque la membrane cellulaire n'apparaît pas avant le stade blastodermique. L'ADN est injecté dans le pôle postérieur de l'œuf de drosophile avant la formation des cellules polaires, à l'origine des cellules germinales. Si l'ADN exogène s'incorpore dans un des chromosomes de ces cellules, il peut alors être transmis à la descendance. Le stade de développement et la région de l'œuf où sera micro-injectée la solution d'ADN sont donc des facteurs déterminants pour le succès de cette technique.

1-2- Préparation de la solution injectée

Pour la micro-injection d'ADN, le principe consiste à injecter simultanément deux plasmides dans les embryons : un premier plasmide contenant une des constructions d'ADN pP{promIFa-GAL4} ou pP{UAS-Gène IFamide} ou pP{UAS-GAN} (GAN : Gène Artificiel de Neuropeptide) dont l'élaboration est décrite dans la section 17 et comme deuxième plasmide, le plasmide "helper" pp25.7wc. Ce dernier est en effet indispensable pour réaliser la transformation par l'intermédiaire de l'élément P puisque, contenant la séquence codante pour la transposase, il permet la synthèse de cette enzyme nécessaire à l'insertion de toute séquence située entre les répétitions terminales de l'élément P.

Le mélange d'injection contient une proportion spécifique de ces deux ADN. La concentration du plasmide "helper" (0,2 mg/ml) et celle de l'ADN du plasmide à insérer (0,5 mg/ml) sont utilisées avec un ratio molaire de 1:3. Pour permettre une meilleure

homogénéisation et enlever quelques impuretés, l'ADN des deux plasmides est co-précipité dans un mélange d'acétate d'ammonium 3 M, pH 5,2 et d'éthanol 100%, puis repris dans le tampon d'injection (KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 0,1 mM à pH 7,8) pour une concentration finale de 0,5-0,6 mg/ml.

1-3- Le système d'injection

La technique de micro-injection des embryons de drosophile a été pratiquée initialement dans le laboratoire du Docteur S. Birman au laboratoire de Génétique et Physiologie du développement à l'université de Luminy (Marseille) puis dans notre laboratoire. Le système est constitué d'un microscope inversé (Axiovert 25, Zeiss), d'un micromanipulateur (Leitz), d'un système de seringue relié à une bouteille d'azote exerçant une pression sur le contenu de l'aiguille et d'aiguilles en verre (Femtotip Eppendorf). Le micromanipulateur, soutenant l'aiguille contenant la solution à injecter, est incliné de 10° par rapport aux embryons. L'extrémité de l'aiguille est cassée pour faciliter le passage de la solution à injecter. Par ailleurs, pour éviter que celle-ci ne se bouche rapidement, la solution à injecter est brièvement centrifugée (13000 g, pendant 10 s) avant le remplissage de l'aiguille (10 ml) à l'aide d'un cône plastique pour une pipette de 200 ml.

1-4- Préparation des embryons et injection

Afin que tous les embryons soient au même stade de développement lors de l'injection, on synchronise la ponte et le prélèvement des œufs. Ainsi, les mouches femelles âgées de 5 jours sont mises à pondre à l'obscurité pendant 15 à 20 min à 25°C sur des lames recouvertes de milieu nutritif. Les lames sont alors retirées et l'on traite les embryons dans les minutes qui suivent. L'œuf est enveloppé du chorion qui assure une protection mécanique tout en laissant possible la pénétration des spermatozoïdes par le micropyle et la respiration de l'embryon par les cornes respiratoires. Le protocole habituel d'injection consiste à retirer le chorion, mais nous n'avons pas réalisé cette opération. Bien que le taux de transformation des embryons non déchorionés semble moins important, cela est largement compensé par le gain de temps obtenu et ainsi, il a été possible d'injecter beaucoup plus d'œufs.

Avant l'injection, les œufs sont alignés sur des bandelettes de scotch double face collées sur des lames en verre. Ces dernières sont préparées au moins trois jours à l'avance pour laisser évaporer les produits volatils du scotch qui s'avèrent toxiques pour les embryons. L'alignement des œufs se fait dans la même orientation (micropyle à gauche) pour ne pas avoir à retourner la lame après chaque injection. Après avoir recouvert les embryons avec de

l'huile Voltalef 10S (Sigma) pour les rendre plus transparents, on fait la mise au point sur les embryons, on positionne l'aiguille dans la couche d'huile en manipulant l'aiguille dans les trois dimensions. On réalise un réglage préliminaire de la pression grâce à un boîtier relié à la bouteille d'azote pour ajuster le volume des gouttelettes avant l'injection. Les embryons sont piqués en pénétrant rapidement l'aiguille dans le pôle postérieur et juste avant de retirer l'aiguille, on injecte la solution. Cette opération est très importante et a pour but d'éviter qu'ils perdent trop de cytoplasme lors de la piqûre.

1-5- Soins aux embryons après injection

Les bandelettes de scotch contenant les embryons de chaque série d'injection sont transférées dans des boîtes de Pétri dans lesquelles on a préalablement coulé le milieu de ponte et dont la surface est recouverte de levure boulangère, de manière à nourrir les larves de premier stade ayant survécu à l'injection. Ces boîtes sont placées en chambre humide à 18°C toute la nuit. Le lendemain, les larves sont récupérées et placées dans des tubes de milieu nutritif classique.

2- Obtention de lignées transgéniques stables

2-1- Détermination de la localisation chromosomique de l'élément P

Le génome de la drosophile se répartit en quatre chromosomes. Sur ces quatre chromosomes, l'un est très petit (chromosome 4) et le reste du génome se distribue entre cinq grands bras chromosomiques de longueur proche. Le chromosome 1 (chromosome sexuel X) comprend essentiellement un seul bras, les chromosomes 2 et 3 en comprennent deux.

Dans un premier temps, on détermine si l'insertion de l'élément P s'est réalisée sur le chromosome X. Pour cela, on croise des femelles vierges w^- avec des mâles possédant l'élément P donc ayant les yeux colorés conférés par la présence du gène mini- *white* (w^+) et si à la génération suivante, seules les femelles possèdent les yeux colorés alors l'élément P est inséré sur le chromosome X.

Par contre, si l'élément P n'est pas inséré sur le chromosome X, on croise alors des mâles possédant l'élément P $\{w^+\}$ avec des femelles vierges de la lignée w^- ; Drl/CyO (CyO étant un marqueur phénotypique de la lignée balancer du chromosome 2). À la génération suivante, nous réalisons le croisement entre des mâles et femelles vierges P $\{w^+\}$ /CyO et à la deuxième génération, si nous obtenons uniquement des individus w^+ , c'est que l'élément P s'est inséré sur le chromosome 2.

Si l'élément P n'est pas inséré sur le chromosome 2, nous réalisons le croisement des mâles possédant l'élément P {w+} avec des femelles vierges de la lignée w⁻, kd/TM3Sb (TM3 étant un balancier du chromosome 3). En F1, nous croisons des mâles et femelles vierges P {w+}/ TM3 Sb et en F2, si nous obtenons uniquement des individus w⁺, c'est que l'élément P s'est inséré sur le chromosome 3.

Dans la grande majorité des cas, l'insertion des éléments P se réalise sur les chromosomes 1, 2 ou 3 et très rarement sur le chromosome 4 du fait de sa petite taille. En effet, aucune des lignées de transformants générées ne possède d'élément P sur le chromosome 4. Ainsi après avoir déterminé la localisation chromosomique de l'élément transposable, il est nécessaire de réaliser des stocks de ces souches en maintenant, si possible, les lignées à l'état homozygote pour le ou les éléments P.

2-2- Réalisation d'un stock

Nous réalisons le croisement entre des femelles vierges P {w+} et des mâles P {w+} pour obtenir une lignée homozygote pour l'élément P {w+}. Si l'emplacement de l'élément P perturbe un gène vital du génome de la drosophile, l'insertion sera donc létale à l'état homozygote et le stock sera ainsi maintenu à l'état hétérozygote avec le balancier approprié suivant l'insertion de l'élément P.

2-3- Détection de la présence des éléments P

La détection du matériel génomique exogène introduit dans le génome de la drosophile a été réalisée par la technique d'amplification par PCR sur les embryons, permettant ainsi de détecter rapidement la présence ou l'absence des séquences injectées. Nous avons réalisé une PCR sur un seul embryon d'après la protocole élaboré par Gloor et Engels en 1992. L'ADN d'embryons est préparé de la façon suivante : un embryon est écrasé dans 10 ml de tampon d'extraction (10 mM Tris pH 8,2, 1mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 mg/ml de protéinase K préparé extemporanément). Après avoir bien homogénéisé l'embryon avec la micropipette dans un tube Ependorff, la solution est incubée pendant 30 min à 37°C, puis pendant 2 min à 95°C et stocké à -20°C. Nous avons utilisé 2 ml de cet extrait pour une réaction PCR de 25 ml en utilisant respectivement l'amorce du vecteur P {Gal4} avec l'amorce PM-2 et l'amorce du vecteur P {UAS} avec avec l'amorce ADN-2 ou P-8*. Pour cela, nous avons commandé une amorce pour chacun des deux types de vecteurs injectés P {Gal4} et P {UAS}.

| | | |
|-------------|------------------------------|----------------------|
| GAL4 | 5'- GCCAATCTATCTGTGACGGC -3' | T _m =59°C |
| UAS | 5'- TTCAATTCAAACAAGCAAAG -3' | T _m =49°C |

3- Remobilisation d'un élément P par transposition

3-1- Principe de la remobilisation

Le principe de la remobilisation d'élément transposable (élément P) consiste à mobiliser par transposition (excision puis insertion) un élément P déjà incorporé dans le génome. L'enzyme responsable de cette transposition est la transposase. Cette remobilisation est réalisée afin d'insérer l'élément P dans une région différente par rapport à son site d'insertion originel, et ainsi de pouvoir augmenter l'efficacité de transcription de la séquence codante de l'élément P. Cette méthode a été également réalisée pour obtenir plusieurs lignées indépendantes pour le même élément P et pour la mutagenèse du gène de l'IFamide.

3-2- Croisements

Pour cela, nous avons croisé une lignée de mouches avec l'élément P à remobiliser avec la souche P{Δ2-3} (lignée P4368) qui possède la source de transposase.

Parents $w^- ; P\{w^{+mc}=UAS-IFamide\} / CyO$ x $y w^- ; ki P\{D2-3\}$
 ou $w^- ; P\{w^{+mc}=UAS-GAN\}$
 ou $y w^- ; P\{w^{+mc}=LacZ\} 12206 / CyO$

En F1, on sélectionne les individus mâles possédant les marqueurs de sélection associés à la présence de l'élément P (phénotype w^+ = yeux colorés) et à la transposase (ki = soies raccourcies et crochues). Ces individus présentent une nouvelle insertion et la mobilisation de l'élément P provoque l'apparition d'yeux mosaïques. Ensuite par un croisement, on enlève la transposase pour immobiliser l'élément P mobilisé. Pour cela, on croise ces mâles avec des femelles issues de la lignée ($w^- ; Drl/Cyo$) qui est une lignée balancier du chromosome 2 possédant les marqueurs phénotypiques yeux blancs et atrophiés et les ailes recourbées.

F1 **mâles** $w^- ; P\{w^{+mc}=UAS-IFamide\} / ki P\{D2-3\}$ x $w^- ; Drl/Cyo$
 ou $w^- ; P\{w^{+mc}=UAS-GAN\} / ki P\{D2-3\}$
 ou $w^- ; P\{w^{+mc}=LacZ\} 12206 / ki P\{D2-3\}$

F2 **mâles** $w^- ; P\{w^{+mc}=UAS-IFamide\}^* / Cyo$
 ou $w^- ; P\{w^{+mc}=UAS-GAN\}^* / Cyo$
 ou $w^- ; P\{w^{+mc}=LacZ\} 12206^* / Cyo$

En F2, les individus mâles ayant les yeux rouges (ou orangés) possèdent l'élément P* qui est censé s'être mobilisé du fait de la transposase. Si la coloration des yeux est différente de celle des mouches avec le transposon originel, alors il est fort probable que l'élément P se soit inséré dans une autre région du génome.

V- METHODES D'ETUDES COMPORTEMENTALES

1- Test de fertilité des mouches

1-1- Analyse des mâles

Des mâles contrôles et expérimentaux sont collectés à l'éclosion, groupés (environ 10 mâles par tube), et âgés de 3 à 5 jours. Un seul mâle est placé individuellement dans un grand tube avec 3 ou 4 femelles vierges et cette expérience est réalisée pour de nombreux mâles. La présence de descendants est déterminée 10 jours plus tard. Les tubes sans descendance, mais dans lesquels le mâle est mort ne sont pas comptabilisés.

1-2- Analyse des femelles

Pour étudier la fertilité des femelles, une seule femelle vierge âgée de 3 à 5 jours est placée dans un tube de nourriture avec 3 ou 4 mâles sauvage pendant 1 h à 25 °C. Chaque femelle est ensuite transférée dans un nouveau tube et la présence de descendance a été observée 7 à 10 jours après.

2- Observations de paires de mouches

Les expériences de comportement sont réalisées dans des coupelles appelées "chambre d'accouplement" de 2,2 cm de diamètre et de 0,4 mm de profondeur. Ces coupelles sont en plexiglas blanc ou gris sauf le couvercle qui est en plexiglas transparent, ce qui permet d'observer et filmer le comportement à l'intérieur des chambres d'accouplements. Ces dernières possèdent une languette de séparation et deux orifices de chaque côté, permettant l'introduction des mouches (Figure 9).

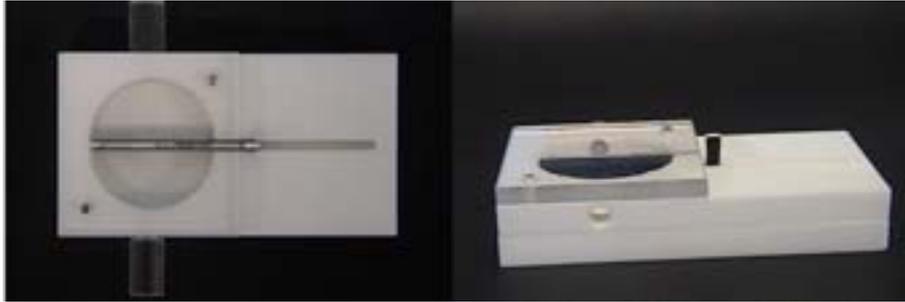


Figure 9 : Photos représentant la chambre d'accouplement utilisée pour les expériences de comportement de cour (en vue de dessus et de côté, source : Glasgow).

Préalablement aux enregistrements des expériences, les mouches sont introduites dans la coupelle avec la languette de séparation afin d'éviter tout contact des mouches entre elles. Après quelques minutes d'acclimatation dans leur nouvel environnement, la languette est tirée ce qui permet la rencontre des deux mouches. Il est à noter que pour toutes les expériences de comportement, les mouches sont doucement manipulées par aspiration à l'aide d'un tuyau adapté, car l'utilisation de l'anesthésie avant les expérimentations perturbe de façon importante le comportement.

Un individu mâle adulte âgé de 3 à 5 jours est placé dans une petite chambre d'accouplement avec soit un mâle, soit une femelle vierge sauvage de même âge. Contrairement aux mâles mutants *fruitless*, dont il est nécessaire qu'ils soient âgés de 7 à 10 jours, les mâles utilisés dans nos expériences et âgés de 3 à 5 jours courtisent aussi bien que les mâles plus âgés. Les mouches sont filmées pendant 10 min. Le mâle qui réalise le comportement de cour est étudié, et son index de cour (IC) ainsi que le paramètre d'appel sexuel (SAP) est déterminé. L'IC correspond au temps (exprimé en pourcentage) que le mâle passe à courtiser la femelle en incluant l'orientation, la poursuite, le tapotement, le léchage, l'extension de l'aile et les tentatives de copulation. Le SAP est déterminé comme le temps où le mâle réalise l'extension de son aile avec un angle de 45 à 90° par rapport à son corps.

3- Observations de trios ou « ménage à trois »

Pour déterminer si un mâle montre une préférence pour un partenaire de même sexe ou de sexe différent, un mâle expérimental âgé de 3 à 5 jours est présenté simultanément à un mâle de génotype différent et une femelle sauvage et ces derniers sont filmés pendant 10 min. Pour le mâle expérimental, on détermine deux IC et deux SAP, un envers le mâle et l'autre envers la femelle.

4- Comportement interactif de plusieurs mâles : Chaining

L'observation du comportement de cour entre plusieurs mâles est réalisée à la température de 25 °C avec une humidité relative de 50%. Un jour avant le début des expériences, les mâles isolés et "vieillis" individuellement entre 3 à 5 jours sont regroupés par âge, par génotype et par groupe de huit individus dans les coupelles contenant le milieu nutritif. Les mâles sont introduits par un orifice et sont laissés toute la nuit pour leur permettre de s'adapter à leur nouvel environnement et à leurs congénères. Le rythme circadien des drosophiles est caractérisé par deux pics d'activité caractérisés entre autres par un niveau d'activité locomotrice plus élevé. Quand les mouches sont entraînées avec une photopériode de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (8-20h), le premier pic s'effectue juste après l'apparition de la lumière (vers 8h30) et le second lorsque les mouches anticipent la fin de la phase diurne (vers 19h30). Pour étudier le comportement dans les conditions où les mouches sont normalement actives, les expériences ont été réalisées lors du premier pic d'activité. On procède à l'enregistrement avec une caméra numérique de l'activité des mâles des différents génotypes et ceci pendant 5 jours consécutifs. Cela nous permet d'étudier le comportement de ces mouches dans le temps et de les comparer avec les différentes lignées étudiées.

On mesure le temps que les mâles passent à se courtiser entre eux et un index de chaining (ICh) peut être déterminé. L'index de chaining représente le temps (exprimé en pourcentage) que les mâles passent à se faire la cour en groupe en formant des chaînes pendant les 10 min d'observation. Une chaîne est définie comme un groupe interactif d'au moins trois mâles sur les huit placés dans la coupelle (Villegla et al., 1997).

5- Enregistrement et traitement des films

Toutes les expériences sont filmées à l'aide d'une caméra numérique (Sony handycam DCR-PC9E et DCR-TRV320E). Ces données ont été ensuite exportées sur un ordinateur Apple G4 avec le logiciel d'acquisition vidéo *iMovie2*. Les films sont traités pour obtenir des séquences correspondant exactement à 10 min d'expérience puis ces films sont compressés sous format MPEG-4 et sont visionnés avec le logiciel *QuickTime*. Pour respecter l'objectivité des observations et donc des résultats, les génotypes ont été codés. Les expériences ont donc été analysées à l'aveugle, c'est-à-dire en ne dévoilant les génotypes des mâles qu'une fois les différents paramètres mesurés.

6- Mesure du comportement locomoteur

L'activité locomotrice est mesurée grâce à l'appareil développé par la compagnie TriKinetics (www.trikinetics.com) piloté par ordinateur à l'aide du logiciel DAM system (Drosophila Activity Monitor system).

Pour déterminer l'activité locomotrice individuelle, une mouche adulte, âgée de 3 à 5 jours, est délicatement introduite par aspiration, à l'aide d'un tuyau adapté, dans des tubes en verre de 6,2 cm de long et de 4 mm de diamètre. Ces tubes sont bouchés aux deux extrémités, d'un côté par un morceau de coton permettant à la mouche de respirer, de l'autre côté par le milieu de culture auquel s'ajoute un bouchon plastique. Ces tubes sont ensuite placés dans des moniteurs contenant 32 emplacements chacun. Au milieu de chaque emplacement, un faisceau infrarouge permet de détecter les mouvements de va et vient de la mouche dans le tube. Chaque passage de la mouche devant le faisceau est détecté et enregistré par un logiciel. Ce dernier affichera la moyenne du nombre de passages des mouches, pour chaque intervalle de 5 min. Ces moniteurs sont placés dans des incubateurs à 25°C avec une photopériode de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (8-20 h) et les mesures sont réalisées pendant six jours consécutifs.

7- Statistiques

Pour les résultats de comportement de paires d'individus et de mesure d'activité locomotrice, nous avons analysé les variances (ANOVAs) en utilisant le logiciel *excel*. Pour comparer les différents génotypes, nous avons pris un seuil de risque de 5%. Comme les résultats de comportement de chaining ne suivent pas une distribution normale, nous avons utilisé le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis pour voir si les résultats des différents génotypes sont significativement différents. Pour obtenir des confrontations intergroupes nous avons reclassé les valeurs par ordre suivant le modèle de Kruskal-Wallis car la variabilité était importante. Ensuite, nous avons analysé par ANOVA les ordres de classement.

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE DEUX NEUROPEPTIDES LA LEUCOKININE ET L'IFAMIDE

INTRODUCTION

Les neuropeptides sont des régulateurs importants de nombreux processus physiologiques, mais à ce jour, chez la drosophile, uniquement quelques uns d'entre eux ont été isolés et séquencés, par les méthodes de purification classique (Baggerman et al., 2002). C'est le cas pour la leucokinine et l'IFamide identifiés dans ce travail.

Grâce à la connaissance de la séquence génomique complète de la drosophile, il a été possible d'y chercher des neuropeptides potentiels basés sur des homologues de séquences avec des neuropeptides connus chez d'autres organismes. Néanmoins, ces données ne démontrent pas que ces peptides sont effectivement produits et ne donnent pas d'information sur l'expression spatiale et temporelle des neuropeptides, ou sur leurs activités physiologiques. Les précurseurs de neuropeptides codent souvent de multiples copies de peptides dont les séquences sont légèrement différentes les unes des autres. En général, les peptides peuvent être prédits dans le gène codant le précurseur (ou prépropeptide) du fait que les sites de clivages protéolytiques utilisés par les convertases sont identifiables (Veenstra, 2000). Ces enzymes coupent la chaîne polypeptidique après les acides aminés dibasiques. Cependant tous ces sites potentiels de clivage ne sont pas utilisés et des sites de clivage non conventionnels peuvent être utilisés ce qui ne permet pas de prédire avec certitude les produits finaux obtenus.

Ainsi, la caractérisation structurale des peptides naturels reste nécessaire, non seulement pour confirmer les sites de clivage des peptides à partir de leur précurseur mais également pour identifier leurs modifications post-traductionnelles qui ne peuvent pas être prédites par la seule séquence d'ADN. Enfin, pour étudier les effets physiologiques d'un neuropeptide, il faut avoir accès au peptide naturel et donc connaître sa structure.

Pour ces raisons, nous avons entrepris l'isolement et l'identification de peptides chez la drosophile et nous décrivons dans ce chapitre, la caractérisation de deux neuropeptides : la leucokinine et l'IFamide.

RESULTATS

1- Isolement et identification de la leucokinine et de l'IFamide

Nous avons réalisé l'isolement des peptides, à partir d'un extrait de 400 g de drosophiles adultes. L'isolement des neuropeptides chez la drosophile a nécessité cinq étapes de purification avec des colonnes possédant des caractéristiques différentes de séparation qui sont les suivantes :

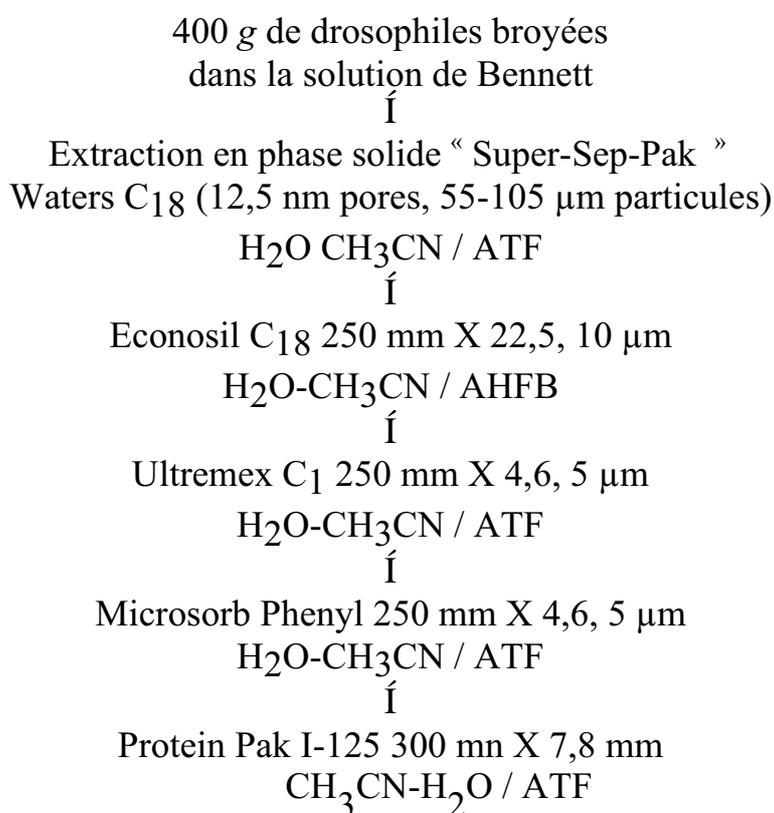


Figure 10 : Procédure d'isolement des neuropeptides leucokinine et IFamide chez la drosophile.

La prépurification sur la colonne chromatographique " Super-Sep-Pak " permet d'éliminer au maximum les grosses protéines avant les séparations en HPLC. En outre, la purification en chromatographie liquide à haute performance possède un pouvoir de résolution remarquable. Cette technique permet de séparer de manière efficace les peptides du fait de l'utilisation d'une élution graduée dans le temps, mais également par l'utilisation de colonnes chromatographiques différentes les unes des autres, et enfin par l'emploi d'agents

d'appariement variés. La première et deuxième étape de séparation en HPLC ont été réalisées respectivement avec les colonnes C-18 et C-1. Etant donné que les mécanismes de séparation sont très différents entre ces deux colonnes, nous avons pu bien séparer le mélange des peptides dans le gradient. La troisième étape a été réalisée sur une colonne Phényle qui favorise les interactions avec les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, His et le Trp). Cependant, comme les caractéristiques de séparation diffèrent peu de celles de la colonne C-18, nous avons changé l'agent d'appariement en remplaçant l'ATF par l'AHFB. Enfin, la cinquième et dernière séparation a été réalisée sur une colonne Protein-Pak qui est généralement utilisée pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Néanmoins, nous l'avons utilisée ici comme une colonne en phase normale et la séparation des peptides est basée sur ses caractéristiques hydrophiles en diminuant le pourcentage du solvant hydrophobe (acétonitrile).

De par la disponibilité d'anticorps dirigés contre la leucokinine I de blatte et de la LFamide de mouche, nous n'avons pas eu besoin d'entreprendre d'essais biologiques pour identifier leur(s) homologue(s) chez la drosophile. Nous avons mis au point des dosages immunoenzymatiques compétitifs dirigés respectivement contre la leucokinine I et la LFamide (Figure 11).

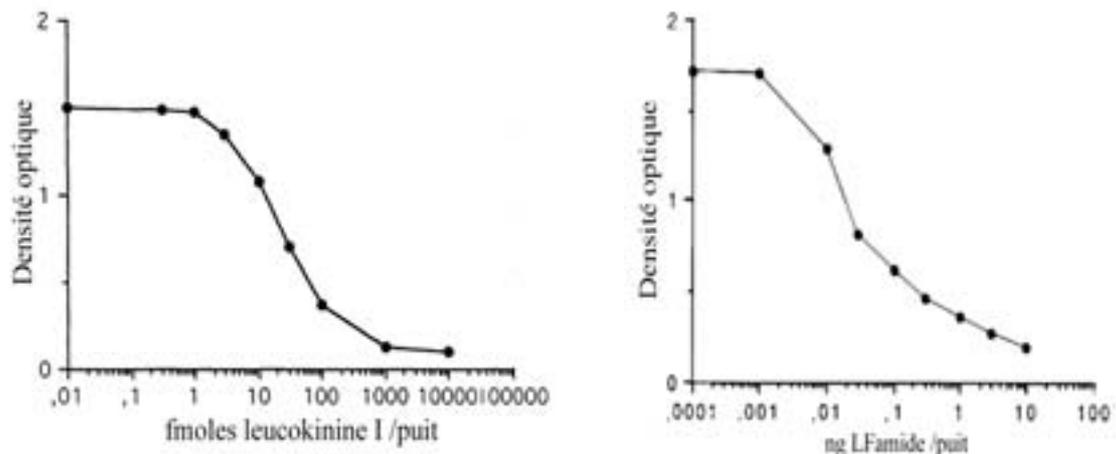


Figure 11 : Courbe dose-réponse pour la leucokinine I et la LFamide.

Après chaque séparation chromatographique en HPLC, les fractions sont récupérées et une partie aliquote correspondant à chaque tube a été testée par dosage immunoenzymatique

EIA pour détecter la présence des peptides possédant une immunoréactivité leucokinine ou LFamide (tableau 3).

| Colonne | Temps de rétention (min) | | Numéro des fractions | |
|--------------------|--------------------------|---------|----------------------|---------------|
| | leucokinine | IFamide | leucokinine | IFamide |
| C-18 | 89,6-92 | 89,6-92 | 113, 114, 115 | 113, 114, 115 |
| C-1 | 36-38 | 57, 58 | 33, 34, 35 | 54, 55 |
| Phényle | 31-33 | 80-83 | 27, 28, 29 | 76, 77, 78 |
| Protein-Pak | 63,4 | 53,8 | 33 | 28 |

Tableau 3 : Temps d'élution et fractions correspondantes du matériel immunoréactif à la leucokinine et à l'homologue de la LFamide chez la drosophile.

Pour l'identification de la leucokinine, nous nous sommes focalisés sur les fractions 113, 114, 115. Il est à noter également que lors de la première étape de séparation en HPLC, les peptides immunoréactifs à la leucokinine et à la LFamide étaient élués dans les mêmes fractions. Nous n'avons détecté qu'un seul peptide immunoréactif à la leucokinine alors qu'il en existe trois chez le moustique *Aedes aegypti* (Veenstra et al., 1997) et huit leucokinines chez la blatte *Leucophaea maderae* (Holman et al., 1990). De même, nous n'avons trouvé qu'un seul peptide apparenté à la LFamide ce qui est le cas également chez le moustique *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002).

Lors de l'étape de purification finale, la leucokinine est bien séparée des dernières impuretés avec uniquement trois contaminants mineurs. Le peptide est élué sur la colonne en un seul pic comme le montre la figure ci-dessous.

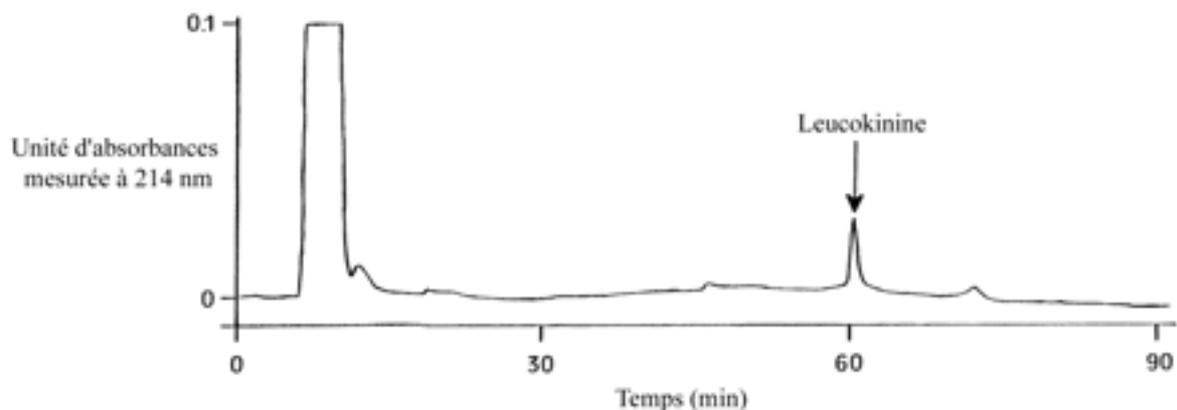


Figure 12 : Chromatogramme de l'étape de purification finale en HPLC de la leucokinine de drosophile. Le pic indiqué par la flèche contient toute l'immunoréactivité à la leucokinine.

Pour la séparation de l'homologue de la LFamide, il y a un deuxième pic important mais qui est bien séparé de l'homologue de la LFamide comme le montre le chromatogramme ci-dessous.

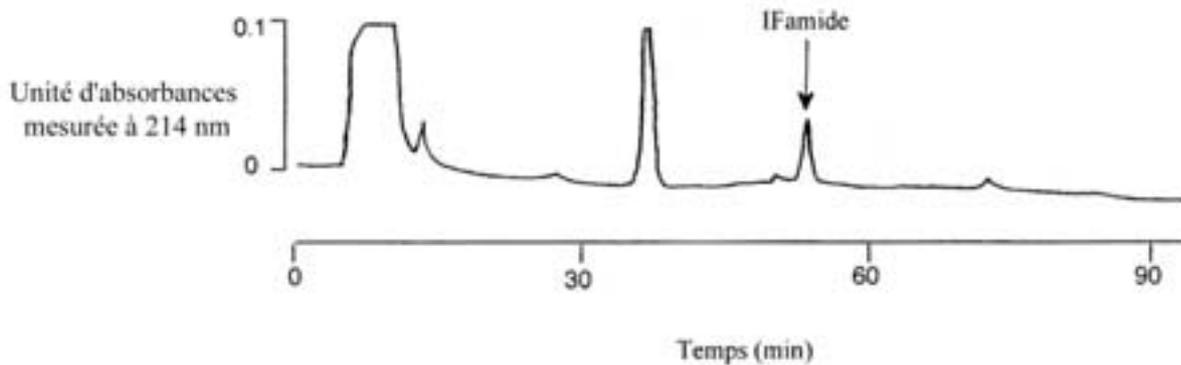


Figure 13: Chromatogramme de l'étape de purification finale en HPLC de l'homologue de la LFamide de drosophile.

L'analyse par la dégradation d'Edman a été réalisée sur un tiers de la quantité totale obtenue de peptide purifié en tant que leucokinine et la même quantité a été prise pour l'homologue de la LFamide. L'analyse à l'aide d'un séquenceur automatique de protéines rapporte les séquences primaires suivantes pour la leucokinine et l'IFamide de drosophile et montrent une quantité totale approximative de 600 et 1200 picomoles respectivement :

Leucokinine de drosophile

Asn-Ser-Val-Val-Leu-Gly-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-His-Ser-Trp-Gly

IFamide de drosophile

Ala-Tyr-Arg-Lys-Pro-Pro-Phe-Asn-Gly-Ser-Ile-Phe

La chimie de la dégradation d'Edman ne permet pas de déterminer si la partie C-terminale des peptides correspond à une amide ou non. Cependant, il est important de noter qu'une grande majorité des peptides sont amidés chez les invertébrés et que c'est également souvent le cas pour les peptides de vertébrés.

En ce qui concerne les leucokinines préalablement identifiées, toutes sont connues pour avoir une amide en position C-terminale, et cela a donc été supposé pour la leucokinine de drosophile. De plus, le dosage immunoenzymatique utilisé ne reconnaît pas les leucokinines qui n'ont pas leur extrémité C-terminale amidée (Veenstra, 1994).

Pour l'homologue de la LFamide de la drosophile, comme le nom l'indique, le peptide possède une amide en position C-terminale et la présence du résidu glycine dans la séquence génomique de l'IFamide (ou de la leucokinine par ailleurs) font que pour ces raisons, il paraît probable que ce peptide mature soit également amidé.

Ainsi, les deux peptides ont été synthétisés avec leur extrémité C-terminale amidée. Le temps de rétention des peptides synthétiques sur la colonne Phényle comparé avec le reste du matériel isolé s'est avéré être identique et confirme donc la présence de l'amide en position C-terminale. En effet, des peptides analogues mais qui diffèrent uniquement par la présence ou l'absence d'une extrémité C-terminale acide feraient éluer les peptides avec un temps de rétention approximativement de deux minutes dans les mêmes conditions d'élution. Ainsi, les structures complètes de la leucokinine et de l'IFamide de drosophile sont :

Leucokinine de drosophile

Asn-Ser-Val-Val-Leu-Gly-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-His-Ser-Trp-Gly-amide

IFamide de drosophile

Ala-Tyr-Arg-Lys-Pro-Pro-Phe-Asn-Gly-Ser-Ile-Phe-amide

2- Gène de la leucokinine

Chez la drosophile, le gène de la leucokinine code un seul peptide (Terhzaz et al., 1999 ; Hewes et Taghert, 2001 ; Vanden Broeck, 2001a). L'existence d'un ADNc de 582 pb, annoté sous le numéro CG13480, permet de conclure que ce gène ne possède pas d'intron.

Chez le moustique *Aedes aegypti*, trois leucokinines ont été isolées à partir d'un extrait d'insectes (Veenstra, 1994), et un ADNc unique codant ces trois leucokinines a été identifié à partir d'une banque d'expression préparée à partir des ganglions abdominaux de la même espèce (Veenstra et al., 1997). La séquence génomique d'*Aedes* n'étant pas connue, on ne sait pas si le gène contient un intron. Cependant, la publication récente du génome du moustique *Anopheles gambiae* par Holt et al. en 2002, a permis d'identifier le gène homologue chez cette espèce. Il code également trois leucokinines qui sont assez similaires de celles d'*Aedes* (Riehle et al., 2002). Bien que le transcript n'ait pas encore été identifié, il paraît fort probable que le gène de la leucokinine contienne un intron chez *Anopheles*.

Lorsqu'on compare les trois précurseurs des leucokinines (Figure 14), on note que la similarité est limitée aux séquences des leucokinines elles-mêmes, la séquence autour du site de clivage de furine (Arg-X-Arg-Lys) et une séquence située juste devant la séquence codant les leucokinines. Le site potentiel de clivage de furine, présent chez *Aedes*, est très bien conservé chez *Anopheles*, et il est probablement aussi fonctionnel chez *Drosophila*. Dans la partie du précurseur contenant les peptides leucokinines, on retrouve quatre résidus de cystéine chez les deux espèces de moustiques, mais seulement deux chez la drosophile. Tous les résidus de cystéines ont été parfaitement conservés, suggérant ainsi qu'ils forment deux pont disulfures chez les moustiques et un seul chez la drosophile.

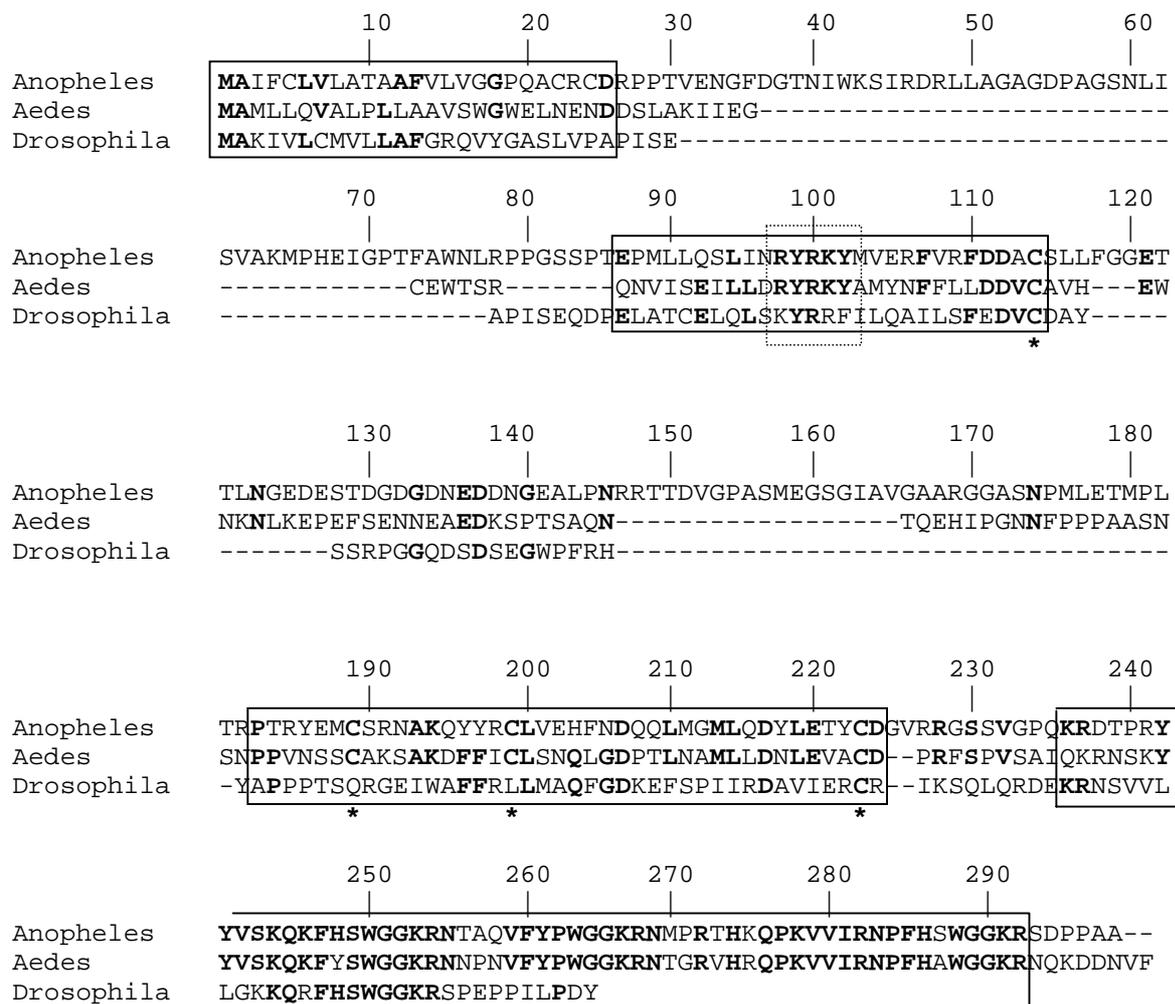


Figure 14. : Comparaison de la séquence des précurseurs des leucokinines des moustiques *Anopheles* et *Aedes* avec celle de *Drosophila*. Les acides aminés identiques sont représentés en gras et les résidus cystéines sont indiqués par un astérisque. Les séquences présentant des similarités sont encadrées, et la boîte en pointillé indique le site potentiel de clivage de furine.

3- Analyse du gène et de l'ADNc codant l'IFamide

Le séquençage du génome de la drosophile a été publié par Adams et al. en 2000, mais certaines parties étaient déjà disponibles avant la publication, ce qui nous a permis de rechercher le gène potentiel de l'IFamide. Ce gène est situé dans la région 60 D5-D7 du bras droit du chromosome 2. Afin de déterminer l'ADNc complet de l'IFamide, nous avons désigné des amorces IFa-1 et IFa-2 dans le gène de l'IFamide pour amplifier par la technique de PCR, l'ADNc présent dans une banque d'expression préparée à partir de tête de drosophile. Sur environ 1,5 million de clones au total, nous avons trouvé un clone qui permettait d'amplifier, de façon attendue, une bande de 270 pb avec les amorces IFa-1 et IFa-2 ou une bande de 400 pb avec les amorces IFa-1 et IFa-3.

Étant donné les difficultés que nous avons rencontrées pour obtenir un produit PCR bien amplifié avec l'amorce λ gt11-1 du bactériophage, nous avons utilisé une amorce plus longue, que nous avons appelé λ gt11-1'.

| | | |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------|
| λ gt ₁₁₋₁ | 5'- GACTCCTGGAGCCCG -3' | T _m =53°C |
| λ gt ₁₁₋₂ | 5'- GGTAGCGACCGGCGC -3' | T _m =57°C |
| λ gt _{11-1'} | 5'- ACTGATGGAAACCAGCCATC -3' | T _m =58°C |

Après avoir réalisé deux PCR, l'une avec les amorces λ gt11-1 et IFa-2 et l'autre avec les amorces IFa-1 et λ gt11-2, nous avons obtenu deux produits PCR, respectivement de 1050 pb et de 550 pb que nous avons subclonés dans le vecteur pCR-TOPO. Les plasmides pCR-ADNc1 et pCR-ADNc2 ont été séquencés dans les deux directions, et ont donné la séquence représentée dans la figure ci-dessous.

```

5'-ccggtttctaacacagctcagaccttccttcctttcactgccacaacgctc 52
accgaaaactgcaag atg gct ctt cga ttc aca ctc act ctg ctc ctg 100
      met ala leu arg phe thr leu thr leu leu leu 11
      ◀-----▶
gtc acg atc ctg gtc gca gcc ata ctt ttg ggc tcc agt gag gca 145
val thr ile leu val ala ala ile leu leu gly ser ser glu ala 26
----- peptide signal -----▶
gcc tac agg aag cct ccg ttc aac ggc agc atc ttc ggc aaa cgc 190
ala tyr arg lys pro pro phe asn gly ser ile phe gly lys arg 41
◀----- IFamide -----▶

aac agc cta ggt aag tcg aaa atc cgt atc ccg tta aag cct cca 235
asn ser leu gly lys ser lys ile arg ile pro leu lys pro pro 56

cca ata tcc cct tcc aga cta cga cag cgc caa aat gag cgc cgt 280
pro ile ser pro ser arg leu arg gln arg gln asn glu arg arg 71

ttg cga ggt ggc cat gga ggc gtg tcc cat gtg gtt tcc cca gaa 325
leu arg gly gly his gly gly val ser his val val ser pro glu 86

cga cag caa ata gga cca cgc cct gcg act ccg cct cca aga act 370
arg gln gln ile gly pro arg pro ala thr pro pro pro arg thr 101

gat ctc gag cct acg act aac aca cca gcg aca ggt ggg cag atg 415
asp leu glu pro thr thr asn thr pro ala thr gly gly gln met 116

ctg tgc ctg ctc gtg cga ctg aat gtg gaa atg ccg gac gtt aaa 460
leu cys leu leu val arg leu asn val glu met pro asp val lys 131

aaa gtc atg tat aaa att tat aat gta agc cgt gca tat agg tac 505
lys val met tyr lys ile tyr asn val ser arg ala tyr arg tyr 146

ata gaa ctt atg cca tac ata tac ata caa tac tca ata aac tta 550
ile glu leu met pro tyr ile tyr ile Gln tyr ser ile asn leu 161

cag cac tga aaaaaaa- 3' 566
gln his *** 163

```

Figure 15 : La figure montre la séquence de l'ADNc et les acides aminés déduits du précurseur de l'IFamide de drosophile. La préproIFamide est constituée du peptide signal, de la seule copie du peptide IFamide (indiqués par les flèches). Les nucléotides sont numérotés de l'extrémité 5' en 3' et les acides aminés sont comptés en débutant avec le codon ATG dans le cadre de lecture ouverte et sont représentés sous la séquence nucléotidique. Les résidus Lys-Arg soulignés indiquent le site de clivage de convertase. Le site de polyadénylation de l'ADNc de l'IFa est doublement souligné. Le codon stop est indiqué par des astérisques. La séquence peptidique apparentée au précurseur, indiquée en gras, a été désignée pour produire des anticorps. La séquence de l'ADNc de l'IFamide de drosophile a été déposée dans la base de données Genbank sous le numéro AF 3766801.

Cette séquence d'ADNc contient potentiellement un intron dont nous avons initialement ignoré la présence. Plusieurs arguments prouvent, en effet, que notre séquence d'ADNc n'est pas correcte. Nous avons produit un anticorps dirigé contre une partie de la séquence du précurseur (acides aminés 72 à 91 de la figure 15) et bien que nous ayons obtenu des anticorps très sensibles (confirmé par la technique d'immunoblots), ces anticorps ne reconnaissent pas les cellules à IFamide dans le cerveau de la drosophile. Ce résultat indique que le peptide, choisi pour immuniser les lapins, n'est pas produit et qu'il existe un intron dans la séquence d'ADNc. De plus, l'homologue du gène de l'IFamide chez le moustique *Anopheles gambiae* possède un intron au même endroit de la séquence. Comme les introns sont généralement bien conservés chez les invertébrés, cela confirme clairement la présence d'un intron dans le gène de l'IFamide chez la drosophile. L'analyse correcte du gène de l'IFamide est indiquée dans la figure de la page suivante.

CAGGAGGATGCAGACGCTGCCCCGCCAGGAACTCAAGCTGCTGCGCGAGGAGCAGCGCGAC -419
 GlnGluAspAlaAspAlaAlaArgGlnGluLeuLysLeuLeuArgGluGluGlnArgAsp
 CAGTTGGAGGCGCATCGGAAGGAACTAAAGCTGCGGGACAGCCGGATCCGGGCTCTTAAA -359
 GlnLeuGluAlaHisArgLysGluLeuLysLeuArgAspSerArgIleArgAlaLeuLys
 CGCCAGCGCGGCGACCTGCTCAACGCGTACAAGAAGCAGCTCTACATGATCGACAACCTG -299
 ArgGlnArgGlyAspLeuLeuAsnAlaTyrLysLysGlnLeuTyrMetIleAspAsnLeu
 AAGCGCCAGACCATCTGTTTGGAGCAGTCGGCAGCCATCGGATTCGGCGAGAAGGAGTTC -239
 LysArgGlnThrIleCysLeuGluGlnSerAlaAlaIleGlyPheGlyGluLysGluPhe
 AACAAGGTGCTCGACTGGAATGCCAAGACGtgagccctcctgcattatgaaatccagcct -179
 AsnLysValLeuAspTrpAsnAlaLysThr***

 aggttaagcataactcagctatgtacataagtgg**aatataa**ttacatttttatggtctcac -119
 tcgaaaaactccccaaag**caat**ctggtttt**caatt**atctcgcggtaactcgattagcgcg -59
 cagcatccttctgctcggttggcgag**TATAAA**agtcagggattcgccttgttttgtcaca 1
gaatcatccggttttctaacacagctcagaccttccttcctttcactgcccacaacgctca 61
 ccgaaaactgcaagATGGCTCTTCGATTCACACTCACTCTGCTCCTGGTCACGATCCTGG 121
 MetAlaLeuArgPheThrLeuThrLeuLeuLeuValThrIleLeuV 16

 TCGCAGCCATACTTTTGGGCTCCAGTGAGGCAGCCTACAGGAAGCCTCCGTTCAACGGCA 181
 alAlaAlaIleLeuLeuGlySerSerGluAla**AlaTyrArgLysProProPheAsnGlyS** 36
 ↑ **IFamide**
 GCATCTTCGGCAAACGCAACAGCCTAGgtaagtcgaaaaatccgatatcccgttaaagcctccac 241
erIlePheGlyLysArgAsnSerLeuA 45
 caatatccccttccagACTACGACAGCGCCAAAATGAGCGCCGTTTGGCGAGGTGGCCATGG 301
 spTyrAspSerAlaLysMetSerAlaValCysAspValAlaMetG 60

 AGGCGTGTCCCATGTGGTTTCCCCAGAACGACAGCAAAtaggaccacgccctgcgactcc 361
 luAlaCysProMetTrpPheProGlnAsnAspSerLys*** 72

 gcctccaagaactgatctcgagcctacgactaacacaccagcgacaggtgggcagatgct 421
 gtgcctgctcgtgcgactgaatgtggaaatgccggacggttaaaaaagtcatgtataaaat 481
 ttaatgtaagccgtgcatataggtacatagaacttatgccatacatatacataaaatact 541
caataaacttacagcactgaactcgctctcctgcttcaaattattgaaatattctattag 601
 S

Figure 16 : La figure montre la séquence finale du gène CG4681(annoté par BDGP comme celui qui code le précurseur du neuropeptide IFamide), suivie de la séquence régulatrice potentielle du gène de l'IFamide, du gène de l'IFamide lui même ainsi que de son intron indiqué en italique. Les nucléotides sont numérotés de l'extrémité 5' en 3' à partir du site d'initiation de la transcription (doublement souligné) et les acides aminés sont comptés en débutant avec le codon ATG dans le cadre de lecture ouverte et sont représentés sous la séquence nucléotidique. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par la flèche, suivi de la séquence du peptide IFamide représentée en gras. La boîte indique le site de clivage de convertase. Les codons stop du gène CG4681 et IFa sont indiqués par des astérisques. La boîte TATA et le site de polyadénylation du gène de l'IFa sont indiqués en gras et le triangle indique le commencement de la queue poly-A de l'ADNc.

Le gène *IFa* est très proche du gène annoté sous le numéro CG4681 et seulement environ 120 pb séparent la fin de l'ADNc CG4681 du site d'initiation de la transcription du gène de l'IFamide. Cela indique que les régions régulatrices du gène *IFa* pourraient être concentrées dans cette région. À l'intérieur de cette petite région, il y a une forte densité de sites de liaison potentiels de facteurs de transcription de drosophile comme cela est décrit par le logiciel Mat Inspector (<http://transfac.gbf.de/>) ; il y a un ou plusieurs sites de liaison possibles pour les facteurs de transcription suivants : *Bicoid*, *crocodile*, *deformed (8)*, *dorsal*, *fushi-tarazu*, *hunchback*, *snail (5)* et *suppressor of hairless*. L'analyse du promoteur (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html, Quandt et al., 1995) suggère également que cette séquence d'environ 120 pb est la séquence promotrice potentielle du gène *IFa*.

Nous pensons que la séquence potentielle du site d'initiation de la transcription se situerait en position -78 pb par rapport au codon d'initiation ATG. Le motif de transcription correspondrait à la séquence CACAGAA. Bien que cette séquence ne soit pas précisément corrélée avec les séquences consensus en 5' des gènes d'insectes, elle est identique à celle du gène qui code les neuropeptides FMRFamide chez la drosophile (Taghert et Schneider, 1990 ; Schneider et Taghert, 1988) et elle ressemble au site du départ de l'ARN de plusieurs gènes de protéines de choc thermique (hsp 26 et hsp 27) chez la drosophile (Cavener et Ray, 1991). Les séquences qui peuvent correspondre aux boîtes canoniques TATA (-33) et CAAT (-90 et -102) des promoteurs d'eucaryotes sont localisées à des positions appropriées en amont du site +1.

Le cadre de lecture ouverte (ORF) du gène code une protéine de 72 acides aminés. La méthionine joue le rôle du site d'initiation de la traduction et la séquence entourant l'ATG (CAAG-ATG-GC) présente une forte homologie avec la séquence consensus du site initiation de la traduction qui est C/AAA/C-ATG-GC, appelé site de Kozak. Le codon ATG est suivi de la séquence du peptide signal de 26 acides aminés permettant au propeptide d'entrer dans le réticulum endoplasmique. Le propeptide est ensuite clivé entre Ala-26 et Ala-27. L'algorithme utilisé pour prédire le site de clivage du peptide signal (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/, Nielsen et al., 1997), confirme la séquence prédite du peptide signal de la préproIFamide. Immédiatement située après le peptide signal, suit la séquence indiquée en gras de l'IFamide non mature de 13 acides aminés en position 27-39. Cette séquence finit par un résidu Gly qui est normalement converti en un groupe C-terminal amide par le complexe enzymatique PAM (Peptidyl α -Amidating Monooxygénase). Le résidu Gly est suivi par deux acides aminés dibasiques Lys-Arg, qui forment le site de clivage pour une convertase. L'amidation de l'IFamide a été confirmée par l'identification chimique du

peptide chez la drosophile. La dernière partie de la séquence du peptide apparenté au précurseur prédit un peptide de 31 acides aminés ne possédant pas de similarité de séquence avec d'autres peptides décrits au préalable. Le codon TAG est le codon de terminaison de la traduction. Le site consensus de polyadénylation potentiel AATAAA à l'extrémité 3' est indiqué en gras. La présence de deux cystéines à l'intérieur de la proIFamide suggère la possibilité d'établissement d'un pont disulfure.

La disponibilité récente des séquences génomiques de *D. pseudoobscura* (www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/drosophila/update.html, 2003) et d'*Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002) nous a permis de comparer les séquences des précurseurs des neuropéptides IFamide avec celle de *Drosophila melanogaster* (Figure 17).

| | | | | | | | |
|-------------------------|---|----|----|----|----|----|----|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | | | | | | | |
| <i>D. pseudoobscura</i> | MALRF TLTLLLVTILATAILLSS EAAYRKPPFNGSIFGKR N--GLDYDN- AK--MSAVC | | | | | | |
| <i>D. melanogaster</i> | MALRF TLTLLLVTILVAAILLGS EAAYRKPPFNGSIFGKR N--SLDYDS- AK--MSAVC | | | | | | |
| <i>Anopheles</i> | MASF KVLGSLIVLLVLLALSGHAEAGY RKPPFNGSIFGKR NGNSVDYEG NAKVV LSTMC | | | | | | |
| | | 70 | | | | | |
| | | | | | | | |
| <i>D. pseudoobscura</i> | EVAMEACPMWFPQ ND SK | | | | | | |
| <i>D. melanogaster</i> | EVAMEACPMWFPQ ND SK | | | | | | |
| <i>A. gambiae</i> | EIAAEACQSWFTQ EQKF | | | | | | |

Figure 17 : Comparaison des séquences des précurseurs de l'IFamide de *Drosophila melanogaster* avec celle de *D. pseudoobscura* et celle du moustique *Anopheles gambiae*.

Lorsqu'on compare les séquences des deux précurseurs des peptides IFamide chez *Drosophila melanogaster* et *Drosophila pseudoobscura*, on constate que la similarité est presque totale (93,5% d'homologie).

La comparaison des séquences des précurseurs des peptides IFamide chez le moustique et les deux espèces de drosophiles montre que la similarité, bien que forte pour la séquence de l'IFamide, elle est cependant plus faible pour le reste. L'alignement des séquences des précurseurs d'*Anopheles* et *Drosophila melanogaster* montre un pourcentage d'homologie de 53,2% (41 résidus identiques sur 77 au total) et de 51,9% entre *Anopheles* et *Drosophila pseudoobscura*. L'homologue de l'IFamide chez le moustique est presque identique à l'IFamide de Drosophile et ne diffère que par un seul acide aminé à l'extrémité N-terminale du peptide où une alanine est remplacée par une glycine. Cette comparaison illustre

le fait que, dans la structure des précurseurs de neuropeptides, ce sont les séquences des neuropeptides elles-mêmes qui sont les plus conservées.

4- Localisation de l'IFamide

La localisation des cellules produisant un peptide, le site et la nature de la libération du peptide donnent des indications sur sa fonction. Ainsi, nous avons déterminé le patron d'expression du peptide IFamide dans le système nerveux central aux différents stades de développement.

Nos premières études immunohistochimiques ont été réalisées avec l'anticorps dirigé contre la LFamide, un don du Dr. Janssen (Université de Louvain). Nous avons observé, aussi bien chez la drosophile que chez la mouche *Phormia regina*, la présence de deux paires de cellules et non une seule comme cela a été décrit chez la mouche *Neobellieria bullata* (Janssen et al., 1996). Ces quatre cellules de la *pars intercerebralis* (PI) forment le groupe M2 de cellules neuroendocrines préalablement décrit par Panov (1976). Il est intéressant de noter que ces mêmes cellules neuroendocrines M2 ont préalablement été identifiées avec un anticorps dirigé contre le neuropeptide GRP (Gastrin-releasing peptide) (Veenstra et Yanihara, 1984). En effet en comparant les séquences C-terminales de la LFamide et du GRP, on constate une certaine similarité de structure ce qui pourrait expliquer pourquoi une forte concentration d'anti-GRP est capable de reconnaître la LFamide (Figure 18).

Après avoir identifié l'IFamide, homologue chez la drosophile de la LFamide, nous avons préparé des anticorps dirigés contre ce neuropeptide en immunisant trois lapines différentes. Tous les anticorps de ces trois lapines reconnaissent les quatre mêmes cellules dans la PI. Cependant, nous avons observé en immunohistologie, quelques différences qui concernent les concentrations pour lesquelles on peut les utiliser et leur spécificité. Les anticorps contre l'IFamide peuvent être utilisés dans une gamme de concentration allant de 1/4000 jusqu'à 1/8000 alors que l'anticorps dirigé contre la LFamide ne peut être utilisé qu'à une concentration de 1/2000. Lorsque les anticorps anti-IFamide sont utilisés à des concentrations plus élevées, par exemple 1/1000, ils reconnaissent aussi un matériel immunoréactif localisés dans d'autres cellules. Ces cellules sont présentes dans les mêmes zones où l'on trouve les cellules à PDF. La comparaison entre les séquences des neuropeptides PDF et IFamide montre une légère similarité dans les séquences ce qui pourrait justifier que des anticorps dirigés contre l'IFamide puissent reconnaître le neuropeptide PDF (Figure 18).

| | |
|----------------|---|
| <i>LFamide</i> | AYRKPPFNGSLF- amide |
| <i>GRP</i> | GNHWAVGHLM- amide |
| <i>PDF</i> | NSELINSLLSL PK NMND A-amide |
| <i>IFamide</i> | AYRKPPFNGSIF- amide |

Figure 18 : Comparaison entre les séquences peptidiques des neuropeptides PDF et IFamide d'une part et de la LFamide et du GRP d'autre part.

Cependant, toutes les saignées ne reconnaissent pas ces mêmes cellules. Avec le serum de deux lapines immunisées avec l'IFamide (numéro #16161 et #16095, décembre 1998), ces cellules additionnelles (supposées à PDF) sont déjà reconnues par les anticorps issus de la deuxième ou troisième saignée, mais le titre de l'anticorps des saignées antérieures était trop faible pour être utilisé en immunohistologie. Chez la troisième lapine (numéro #604) ces cellules additionnelles ne sont reconnues qu'après utilisation des anticorps provenant des saignées plus tardives. (1) Étant donné que ces cellules additionnelles ne sont pas marquées par les anticorps issus de toutes les saignées, (2) que ces cellules ne sont pas marquées par hybridation *in situ* (voir section suivante) et (3) que les cerveaux des mouches qui ne possèdent plus les neurones à IFamide (Chapitre 3) ont toujours ces cellules marquées par les anticorps, nous en avons conclu que ces cellules ne produisent pas l'IFamide.

En conséquence, pour les expériences d'immunohistologie, nous avons utilisé les anticorps prélevés sur le lapine #604, les 27 juin 2000 et 19 juillet 2000 dont nous avons bien confirmé, au préalable, qu'ils ne reconnaissent pas ces cellules additionnelles.

Au premier stade larvaire de drosophile, les marquages immunohistologiques ont montré que le peptide est produit par quatre cellules dans la PI et que les cellules et les fibres sont toutes symétriques par rapport à la ligne médiane. Ces deux paires de cellules bilatérales ont leurs axones qui décussent vers le côté controlatéral des lobes cérébraux et se projettent dans le ganglion ventral abdominal (Figure 19). Durant les deuxième et troisième stades larvaires, le patron d'expression n'évolue pas. Le nombre de cellules ne change pas et les fibres axonales et dendritiques ont seulement de petites ramifications. Bien que la signification des connexions formées par les fibres immunoréactives ne soit pas connue, il est probable que le peptide soit bien libéré à l'intérieur du système nerveux.

Figure 19 : Expression temporelle du neuropeptide IFamide dans le système nerveux central de la drosophile sauvage

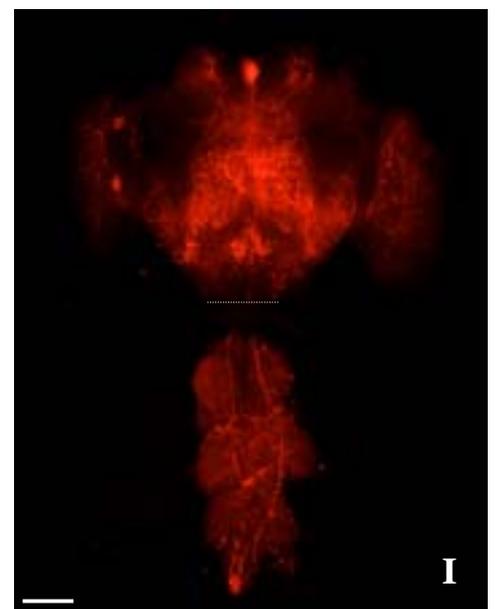
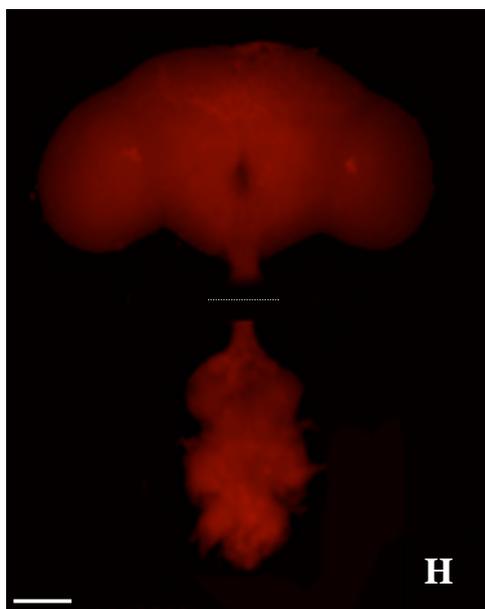
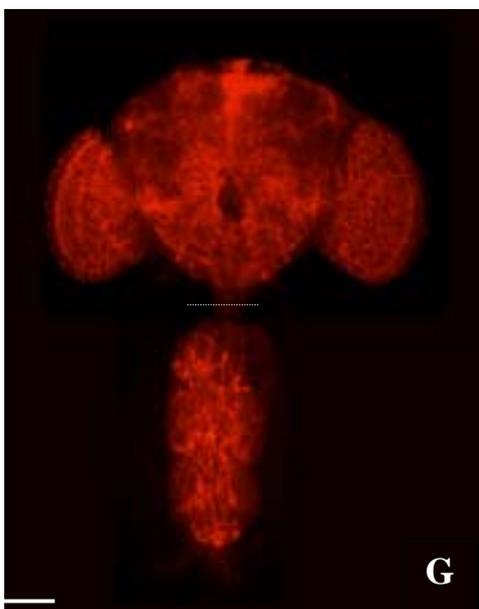
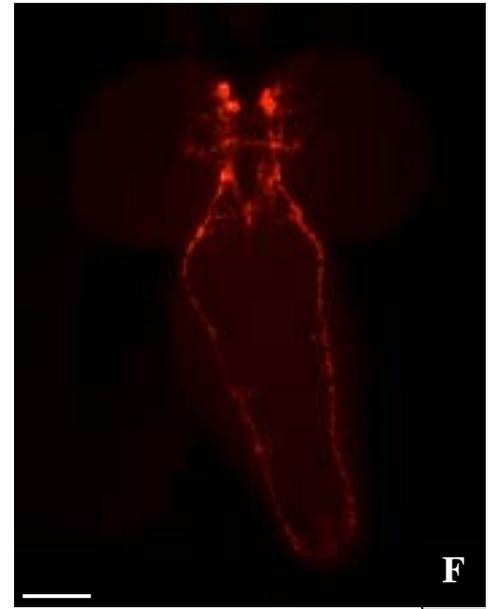
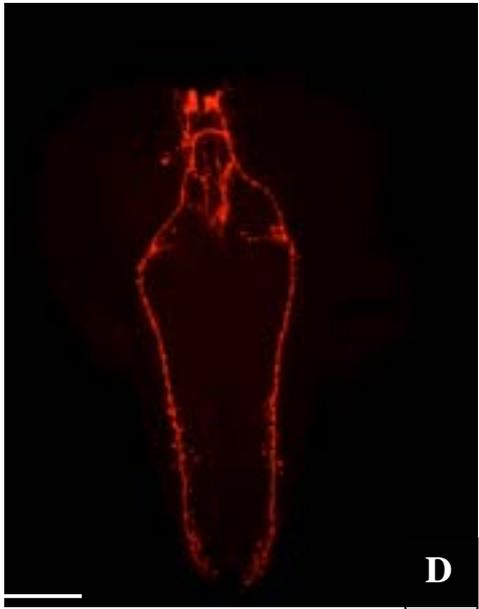
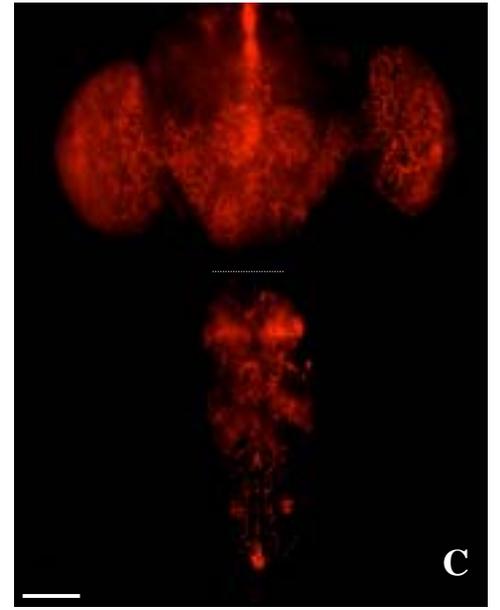
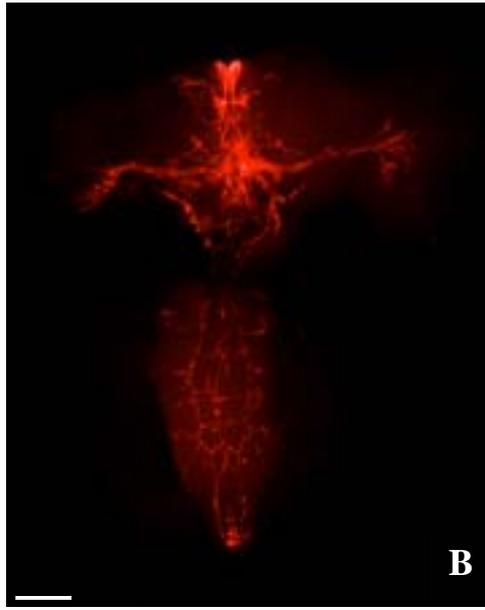
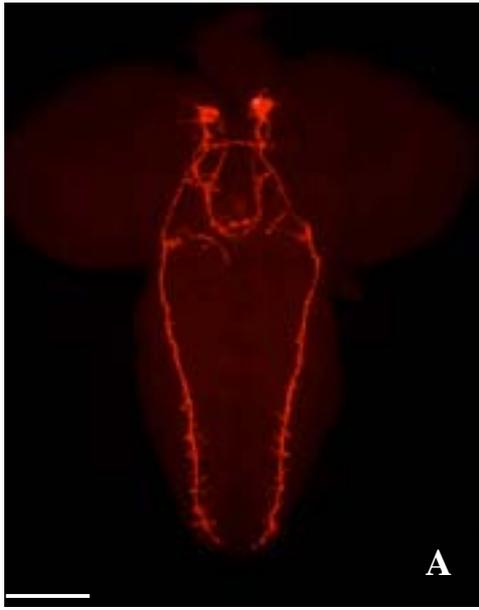
L'immunohistochimie réalisée en utilisant un anticorps dirigé contre l'IFamide montre la présence de quatre neurones situés dans la *pars intercerebralis* de la larve de troisième stade (A), pupa de 3 jours (B) et adulte (C). On peut observer l'énorme expansion des arborisations des fibres immunoréactives des quatre neurones produisant l'IFamide dans toutes les régions du système nerveux central durant le développement et particulièrement dans les structures neuropilaires sensorielles. On note que les lobes antennaires (responsables des informations olfactives), les lobes optiques (responsables des informations visuelles) et les corps pédonculés (responsables du traitement des informations venant des centres olfactifs et visuels) sont fortement innervés. Il est à noter que, aussi bien chez la larve que chez l'adulte, nous n'observons pas d'axones immunoréactifs sortant du système nerveux. La barre d'échelle représente 100 µm.

Expression du neuropeptide IFamide après ablation génétique et sauvetage des neurones à IFamide révélée par immunohistochimie

D, G- Souche sauvage - Patron d'expression classique de l'IFamide dans le système nerveux central de larve de troisième stade et d'adulte sauvage respectivement.

E, H- *promIFa-Gal4 x UAS-rpr* - Absence totale des cellules et des fibres immunoréactives à l'IFamide dans le système nerveux de larve et d'adulte de mouches.

F, I- *promIFa-Gal4/UAS-rpr x UAS-p35* - Maintien des cellules à IFamide et des arborisations axonales et dendritiques dans le système nerveux de larve et d'adulte de mouches. La barre d'échelle représente 100 µm.



Durant le stade pupal pendant lequel se réalise la métamorphose, le système nerveux larvaire change radicalement en taille et en organisation (Truman, 1990). Parmi les changements les plus spectaculaires, on note la croissance et la différenciation des lobes optiques qui vont permettre aux hémisphères cérébraux de s'encapsuler dans la tête tandis que le ganglion thoraco-abdominal se situera dans le thorax de l'adulte. Pendant le développement du cerveau au stade pupal, les arborisations des fibres immunoréactives des quatre neurones produisant l'IFamide s'étendent énormément vers les lobes optiques, les lobes antennaires et le ganglion sous-œsophagien. De plus, les fibres qui se projettent dans le ganglion ventral réalisent des branchements et deviennent plus complexes (Figure 19).

Durant le stade adulte, les corps cellulaires des neurones à IFamide deviennent plus larges et l'intensité du signal et l'arborisation des fibres immunoréactives augmentent de façon significative. À ce stade, il y a une augmentation de l'immunoréactivité dans les axones qui innervent alors une grande partie du système nerveux, notamment les aires des neuropiles sensoriels comme les lobes optiques, les lobes antennaires, les corps pédonculés, le complexe central et le ganglion sous-œsophagien.

Chez la larve, pupa et adulte de drosophile sauvage, l'expression de l'IFamide est limitée à quatre cellules médianes dans la PI dans la région postérieure dorsale du cerveau et la distribution est identique dans le cerveau des deux sexes. Du début du stade larvaire au stade adulte, l'immunoréactivité IFamide est présente dans le cerveau et le ganglion ventral suggérant que le neuropeptide est produit sans interruption pendant le développement, avec une augmentation plus importante, non pas du nombre de cellules, mais de la taille cellulaire et de l'arborisation des fibres immunoréactives ainsi que de la synthèse reflétée par la forte intensité de marquage.

À la différence d'autres cellules neuroendocrines de la PI, ces cellules ne se projettent pas dans les sites neurohémaux de libération comme les corps cardiaques ou les organes neurohémaux abdominaux, et de ce fait, ces cellules ne libèreraient pas le peptide dans l'hémolymphe. Aucune cellule ou axones marqués par l'anti-IFamide n'ont été détectés dans les tissus périphériques, comme l'intestin, les organes génitaux ou d'autres tissus et cela suggère que la synthèse d'IFamide est limitée au système nerveux. Bien que certains neuropeptides d'insectes soient exprimés à l'extérieur du système nerveux central, par exemple dans des neurones périphériques et/ou dans des cellules endocrines de l'intestin, nous n'avons jamais détecté une telle expression de l'IFamide, aussi bien par les techniques d'immunohistochimie que celles d'hybridation *in situ*.

Le patron d'expression des fibres immunoréactives à l'IFamide, dans le système nerveux central, pendant le développement, suggère que le peptide IFamide pourrait agir comme un modulateur dans l'intégration des fonctions du système nerveux central et être ainsi impliqué dans de nombreuses régulations nerveuses à l'état adulte.

5- Localisation de l'expression des ARN messagers de l'IFamide

Pour visualiser l'expression des transcrits de l'IFamide par la technique d'hybridation *in situ*, nous avons préparé une sonde ARN antisens (contrôle positif) et une sonde ARN sens (contrôle négatif) marquée à la digoxigénine.

La détection des ARN messagers a été réalisée sur des systèmes nerveux de larves de troisième stade et d'adultes. Comme le montrent la figure 20, le marquage n'est observé que dans quatre neurones de la *pars intercerebralis* et ceci aussi bien chez la larve que chez l'adulte.

Sur ces mêmes cerveaux de larves et d'adultes, nous avons réalisé un immunomarquage avec l'anticorps anti-IFamide et nous avons confirmé que les quatre cellules qui expriment le gène de l'IFamide produisent également le peptide IFamide.

6- Mutagenèse du gène de l'IFamide

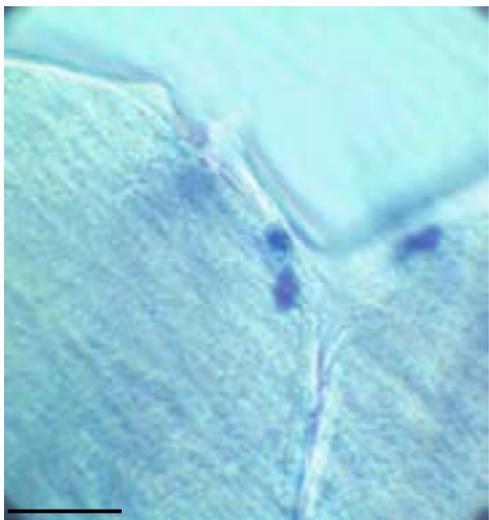
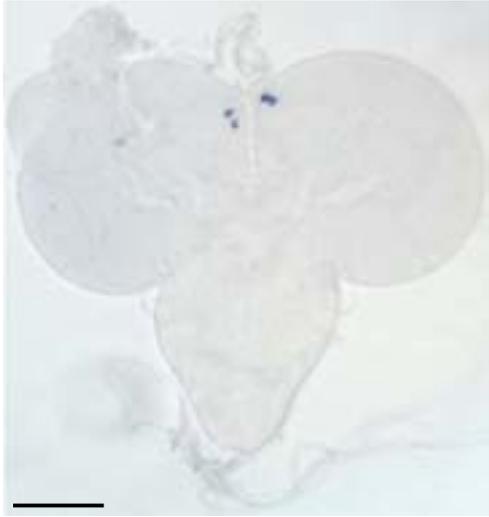
Afin de mieux comprendre le rôle physiologique de l'IFamide, nous avons tenté de créer, par la technique de mutagenèse par intégration de transposon ou d'élément transposable, des souches de drosophiles ayant des allèles nuls pour le gène de l'IFamide. La technique a consisté à remobiliser un élément P dans le gène de l'IFamide, afin de perturber voire réprimer son expression.

Pour cela, nous avons utilisé une souche avec un élément P (Bloomington #12206) le plus proche possible du gène de l'IFamide. Il se situe à environ 18,9 kpb du gène *IFa* ce qui est un peu éloigné mais il est néanmoins utile par la présence du gène marqueur lacZ. Lorsque cet élément P s'insère dans un gène, l'expression de l'enzyme β -galactosidase peut devenir détectable par une coloration X-gal et dans le cas de l'insertion dans le gène de l'IFamide, son expression est attendue dans les cellules à IFamide (Figure 21).

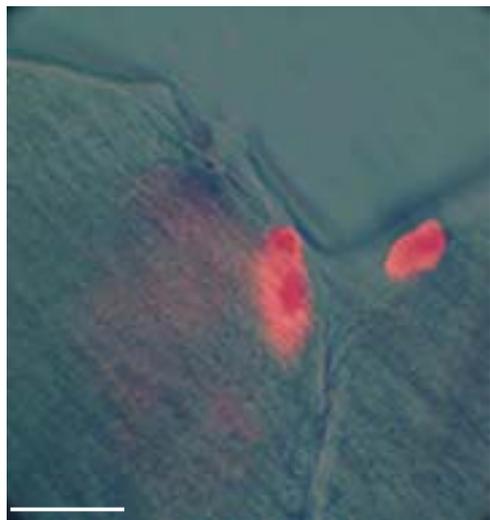
Après avoir obtenu des lignées de drosophile dont l'élément P a été remobilisé par rapport à son site originel, nous avons prélevé des cerveaux de larves de troisième stade (entre 5 et 10 pour chacune des lignées générées) et réalisé une coloration au X-Gal. Ainsi, par cette technique, nous avons criblé environ 300 lignées mais malgré nos efforts, nous n'avons pas obtenu de mutant pour le gène *IFa*.

Figure 20 : Localisation de l'expression des ARN messagers de l'IFamide révélés par hybridation *in situ* avec une ribosonde antisens marquée à la digoxigénine

En (A), nous observons le marquage de quatre neurones dans la *pars intercerebralis* (PI) du système nerveux de larve de troisième stade, en (B) le même cerveau avec la région correspondant à la PI agrandie 3 fois. En (C), l'expression des transcrits est visualisée également dans la même région du cerveau d'un adulte, en (D), le cerveau adulte agrandi 3 fois permettant de mieux distinguer les quatre neurones dans la PI. En (E) et (F), nous avons réalisé séquentiellement les techniques d'hybridation *in situ* puis d'immunohistochimie avec l'anticorps dirigé contre l'IFamide révélé avec un anticorps secondaire couplé à la rhodamine (rouge fluorescent) sur un même cerveau de larve de troisième stade. Nous montrons que les deux méthodes permettant de déterminer l'expression du gène de l'IFamide, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie, mettent en évidence les mêmes cellules. La barre d'échelle représente 100 mm pour les photos A et C et 50 mm pour les photos B, D, E et F.



E



7- Obtention de lignées transgéniques

Ainsi, en l'absence de mutant pour le gène de l'IFamide, nous avons créé des souches de drosophiles ne possédant plus les neurones à IFamide. Afin de pouvoir manipuler ces neurones, nous avons créé des mouches portant un transgène dans lequel la séquence promotrice potentielle du gène de l'IFamide dirige l'expression du facteur de transcription GAL4. Pour cela, nous avons construit l'élément P {promIFa-GAL4} en prenant une séquence de 1,5 kpb en amont de la séquence codante du précurseur de l'IFamide.

Après avoir injecté 3120 embryons de drosophile, seulement 172 larves ont survécu à l'injection et uniquement 73 individus se sont développés jusqu'au stade adulte avec quelques individus stériles supplémentaires. Néanmoins, nous avons obtenu trois lignées indépendantes de transformants. Deux de ces lignées portent l'élément P situé sur le chromosome 2 et une lignée porte l'élément P inséré sur le chromosome 3.

Ces lignées ont été croisées avec des lignées possédant les gènes rapporteurs codant la protéine verte fluorescente (GFP et mCD8-GFP) ou l'enzyme b-galactosidase (gène LacZ). Dans la descendance, la visualisation de l'expression de la protéine fluorescente ou celle de l'enzyme b-galactosidase après coloration au X-gal a été réalisée. Comme le montrent les photos de la figure 21, nous observons du marquage, sur les cerveaux de larves de troisième stade, uniquement dans les quatre cellules de la *pars intercerebralis* qui expriment normalement l'IFamide.

Nous avons ainsi établi que la séquence de 1,5 kpb en amont du gène de l'IFamide est suffisante pour obtenir l'expression spécifique aux cellules à l'IFamide. Comme pour le marquage avec l'anticorps dirigé contre l'IFamide et par la technique d'hybridation *in situ*, aucune expression des différents gènes rapporteurs testés n'a été décelée en dehors du système nerveux chez la larve ou chez l'adulte. Ces résultats confortent l'idée selon laquelle, seules quatre cellules localisées dans la PI expriment le neuropeptide IFamide dans l'insecte entier.

Figure 21 : Visualisation de l'expression de gènes rapporteurs dans les cellules à IFamide

A- *Expression de la protéine verte fluorescente (GFP) et de la protéine mCD8 dans un système nerveux de larve de 3^{ème} stade issu du croisement de la lignée P{promIFa-Gal4} avec la lignée P{UAS-mCD8-GFP}.*

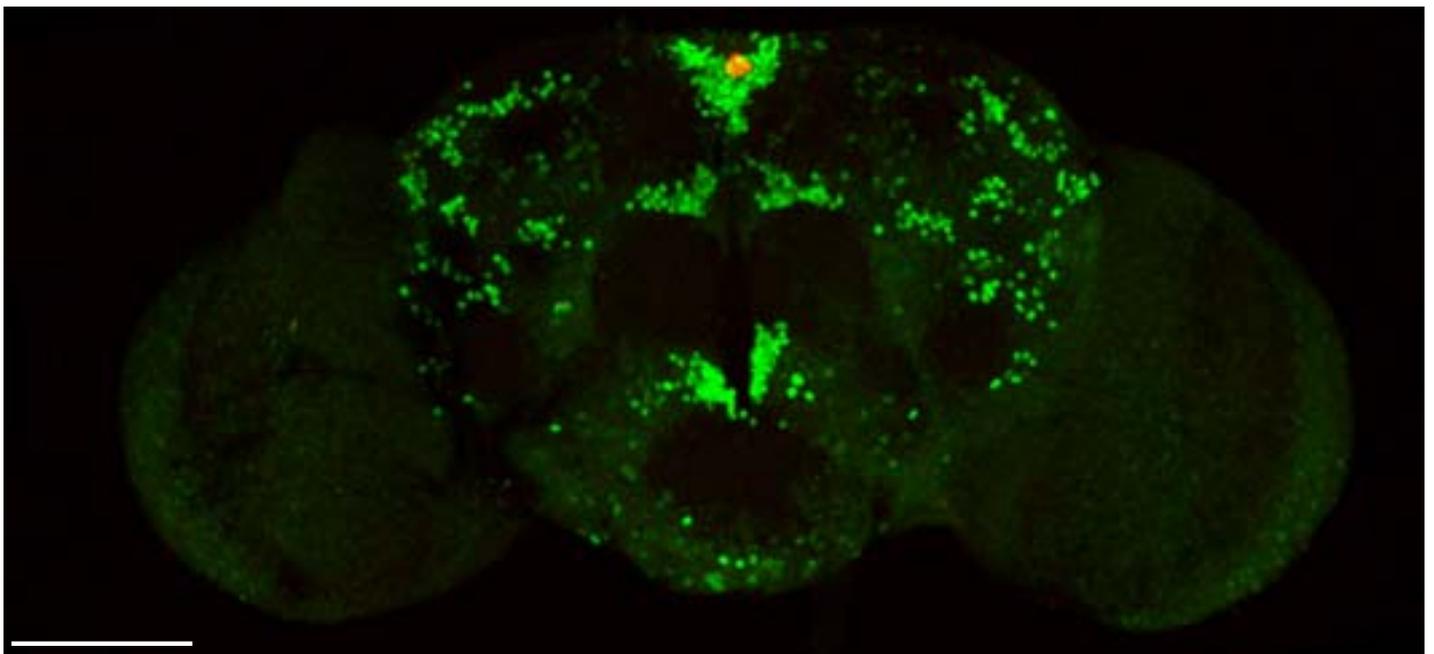
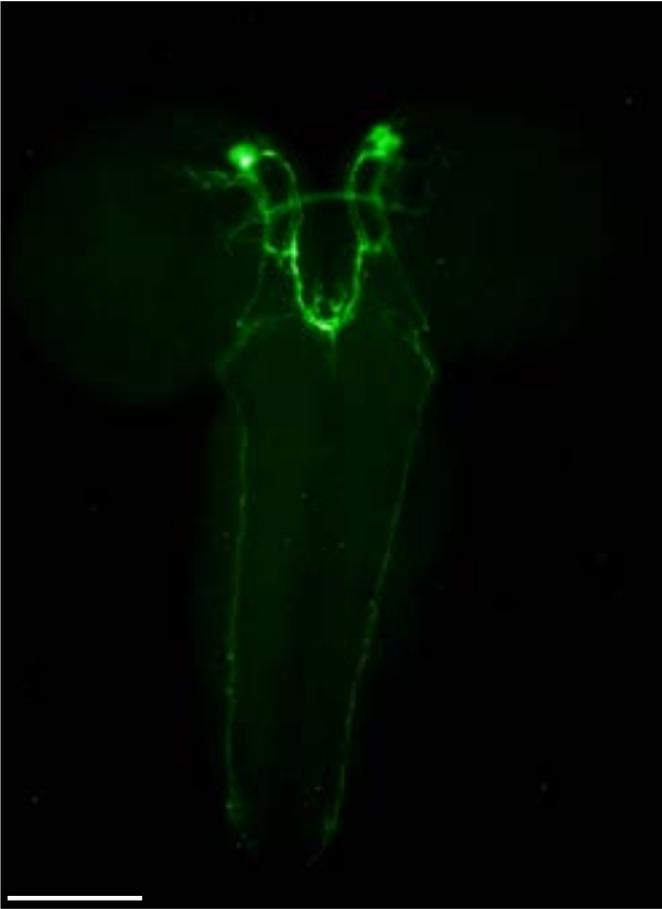
La fluorescence verte de la protéine GFP est directement visualisée au microscope, tandis que la protéine mCD8a est reconnue par un anti-mCD8a, puis révélé par un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 qui apparaît également en vert au microscope. La protéine mCD8 est un marqueur membranaire transporté le long de l'axone alors que la protéine GFP se localise plutôt dans le corps cellulaire. Ainsi, nous observons quatre cellules dans la PI avec leurs axones respectifs qui décussent vers le côté controlatéral du protocérébrum et se projettent dans le ganglion ventral abdominal. Nous avons préalablement observé que ces cellules qui expriment la protéine GFP produisent également le neuropeptide IFamide après révélation avec un anti-IFamide (observations non montrées). La barre d'échelle représente 100 μ m.

B- *Expression de l'enzyme b-galactosidase, après coloration au X-Gal, dans un système nerveux de larve de 3^{ème} stade issu du croisement de la lignée P{promIFa-Gal4} avec la lignée P{UAS-LacZ cytoplasmique}.*

La coloration au X-Gal met en évidence le même patron d'expression des cellules à IFamide et leurs axones comparé au marquage révélé avec l'anti-IFamide. La barre d'échelle représente 100 μ m.

C- Absence d'expression de la protéine Fru^M dans les cellules à IFamide : *expression de la protéine Fru^M (forme mâle de la protéine codé par le facteur de transcription Fruitless) et de l'enzyme b-galactosidase dans un système nerveux d'adulte de 5 jours issu du croisement de la lignée P{promIFa-Gal4} avec la lignée P{UAS-LacZ nucléaire}.*

Les cellules exprimant la protéine Fru^M sont marquées par un anticorps anti-Fru^M puis révélé par l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488. Le noyau formé par les quatre cellules à IFamide, exprimant l'enzyme b-galactosidase, est marqué par un anti-b-gal puis par l'anticorps secondaire marqué par le texas red. Nous observons l'absence de co-localisation entre les cellules qui expriment la protéine Fru^M et celles qui expriment le neuropeptide IFamide. La barre d'échelle représente 100 μ m.



8- Ablation et sauvetage des neurones à IFamide

8-1- Approche utilisée

Chez la drosophile, plusieurs moyens d'éliminer expérimentalement l'activité endogène de neurones ont été utilisés par divers auteurs. Parmi eux, une approche consiste à détruire complètement des neurones par expression de toxines exogènes, comme des toxines diphtériques ou la ricine (Kunes et Steller, 1991; Moffat et al., 1992; Bellen et al., 1992). Plus récemment, d'autres auteurs ont utilisé des protéines endogènes de drosophile qui enclenchent des programmes de mort cellulaire, comme les protéines proapoptotiques Reaper, Hid ("Head Involution Defective") et Grim (White et al., 1994 ; Grether et al., 1995 ; Chen et al., 1996). Ces molécules apoptotiques ont été utilisées avec succès pour entraîner l'élimination de cellules peptidergiques, comme les neurones qui produisent l'hormone d'éclosion (Mc Nabb et al., 1997). Dans une étude réalisée en 1999, Renn et al. ont éliminé les neurones exprimant le neuropeptide PDF en induisant l'expression de la molécule apoptique Reaper. Les animaux sans neurones à PDF ont un rythme circadien fortement perturbé et les effets induits sont identiques à ceux qui sont observés chez des mutants dépourvus de ce même neuropeptide. En permettant la survie de ces neurones grâce à la co-expression de la molécule Reaper et de son inhibiteur p35, les auteurs ont montré que les animaux ont un comportement circadien normal. Ainsi, la possibilité d'éliminer avec succès les neurones peptidergiques par la molécule Reaper et celle d'utiliser son inhibiteur p35 (White et al., 1996) permettent de contrôler spécifiquement la mort et la survie des neurones étudiés et de montrer que les effets observés sont uniquement dus à la présence ou l'absence de ces cellules. C'est par cette méthode élégante que nous avons donc choisi d'éliminer les neurones à IFamide.

8-2- Ablation des neurones à IFamide révélée par immunohistochimie

Pour cibler l'ablation des neurones à IFamide, nous avons utilisé le système UAS_G-Gal4 pour exprimer des protéines proapoptotiques. À cette fin, nous avons utilisé les lignées homozygotes pour le P{promIFa-GAL4} que nous avons croisées avec une lignée homozygote pour le gène de mort cellulaire *rpr* seul ou avec une lignée homozygote pour les gènes *rpr* et *hid*, ou encore avec une lignée homozygote pour le gène *bax*.

Par l'intermédiaire de la technique d'immunohistochimie, nous avons déterminé la présence ou l'absence des neurones produisant l'IFamide dans les systèmes nerveux de larve de 3^{ème} stade et d'adulte chez la souche sauvage et chez les descendants issus des différents croisements préalablement décrits (Cf. M&M, I-7-2, Tableau 4 et Figure 19).

| <i>Génotypes</i> | <i>Cerveaux marqués</i> | <i>Cerveaux faiblement marqués</i> | <i>Cerveaux non marqués</i> | <i>Total des cerveaux</i> |
|------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>CS</i> | 15 | 0 | 0 | 15 |
| <i>P2R</i> | 0 | 0 | 8 | 8 |
| <i>P2HR</i> | 0 | 0 | 12 | 12 |
| <i>PBax</i> | 0 | 3 | 12 | 15 |
| <i>P2R/CS</i> | 0 | 6 | 19 | 25 |

Tableau 4 : Quantification de l'immunoréactivité anti-IFamide présente dans les cellules à IFamide dans le système nerveux de la larve de 3^{ème} stade en fonction des génotypes.

Dans la souche sauvage, tous les individus montrent un marquage normal des cellules et des fibres immunoréactives à l'anti-IFamide.

Chez les descendants issus du croisement de la lignée P2R avec la lignée CS, un nombre important des cerveaux ne montre pas de marquage pour le neuropeptide IFamide ce qui confirme la destruction quasi complète des cellules qui le produisent. Seuls 6 individus sur les 25 au total présentent néanmoins de l'immunoréactivité IFamide, mais l'intensité du signal et le nombre de cellules marquées sont cependant moins importants par rapport à la souche sauvage. Par exemple, nous avons observé des cerveaux ne possédant qu'une cellule de petite taille et son axone immunoréactif à l'IFamide. Donc, même si les cellules sont présentes, elles possèdent une morphologie différente avec un corps cellulaire de plus petite taille suggérant la destruction progressive des neurones et au moins un mauvais état fonctionnel.

Les larves provenant de la lignée homozygote P2R, possédant deux copies de l'élément P qui porte la séquence du promoteur de l'IFamide en amont du facteur de transcription Gal4, ne révèlent aucun marquage anti-IFamide démontrant que les neurones ont complètement disparu. Ainsi, nous notons que deux copies de P{promIFa-GAL4} avec deux copies de P{UAS-rpr} sont suffisantes pour permettre d'éliminer efficacement les neurones.

Concernant les larves de la lignée P2HR, aucun des cerveaux ne présente de marquage ce qui reflète la destruction complète des cellules à IFamide par l'action synergique des deux protéines apoptotiques, Hid et Rpr.

Ces données confirment que l'action apoptotique simultanée de Hid et Reaper provoque la destruction complète des cellules (Zhou et al., 1997), alors que la seule action de Rpr (si une seule copie est exprimée) ne la provoque pas. Dans ce dernier cas, la destruction est cependant massive puisqu'elle concerne 80% environ des cellules.

À l'état adulte, les cerveaux des individus P2R/CS présentent un peu de marquage avec de petites arborisations immunoréactives résiduelles mais les corps cellulaires ont complètement disparu (n>10 mâles et femelles). Les adultes P2R et PHR ne présentent aucun corps cellulaire et axone positif à l'anti-IFamide démontrant l'absence des cellules à IFamide (n>10 mâles et femelles).

Les expériences d'ablation génétique des neurones ne nous disent pas précisément à quels stades de développement les lésions éventuelles pourraient avoir leurs effets. Cependant, par l'intermédiaire de la technique d'immunohistochimie, nous avons déterminé que la mort cellulaire induite dans les cellules peptidergiques du cerveau s'opère dès les premiers stades larvaires.

8-3- Sauvetage des neurones à IFamide révélée par immunohistochimie

En éliminant presque complètement les neurones à IFamide avec le transgène UAS-rpr, nous avons pu utiliser le transgène UAS-p35. La protéine p35 de baculovirus est une protéine inhibitrice de caspase qui bloque les effets des molécules proapoptotiques Rpr et Hid et ainsi pourrait éviter la mort cellulaire induite par Rpr et Hid.

En croisant des lignées homozygotes P2R et P2HR avec UAS-p35, nous avons généré des mouches contenant chacune une copie des transgènes Prom IFa-GAL4, UAS-rpr et UAS-p35. En utilisant la technique d'immunohistochimie, nous avons déterminé la présence ou l'absence des neurones produisant l'IFamide chez ces individus (Tableau 5 et Figure 19).

| <i>Génotypes</i> | <i>Cerveaux non marqués</i> | <i>Cerveaux marqués</i> | <i>Total des cerveaux</i> |
|------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>CS</i> | 0 | 5 | 5 |
| <i>P2Rxp35</i> | 0 | 11 | 11 |
| <i>P2HRxp35</i> | 2 | 7 | 9 |

Tableau 5 : Quantification de l'immunoréactivité anti-IFamide présente dans les cellules à IFamide dans le système nerveux de la larve de 3^{ème} stade en fonction des génotypes

À l'état larvaire, les neurones à IFamide sont normaux et survivent même si leur nombre est parfois réduit à trois et que le marquage apparaît moins intense par rapport aux contrôles. Ainsi, l'action de Rpr dans les neurones à IFamide a été largement inhibée par l'expression simultanée de p35 dans ces mêmes cellules. Par contre, nous observons que le sauvetage des neurones à IFamide en co-exprimant p35 avec Rpr et Hid est moins efficace, mais néanmoins, la majorité des individus ont leurs neurones qui survivent.

À l'état adulte, nos observations sont très similaires à celles qui ont été faites à l'état larvaire, à savoir que les neurones sont bien présents, bien que parfois leur nombre soit ramené à trois et que l'immunoréactivité à l'IFamide est moins forte. Cependant, les lobes optiques, les lobes antennaires, le complexe central, le ganglion sous-oesophagien et d'autres structures sont toujours marqués.

DISCUSSION

La purification des peptides a nécessité l'utilisation de seulement quatre étapes de purification en HPLC, donc une étape de moins, si on la compare à l'isolement des leucokinines du moustique *Aedes aegypti* (Veenstra, 1994). En effet, dans ce dernier travail, il a été noté que la différence dans la sélectivité entre les colonnes en phase inverse C-18 et Phényle était très limitée, bien que le pouvoir de résolution de la première colonne C-18 préparative soit remarquable (Veenstra, communication personnelle). C'est pour cette raison que nous avons éliminé une colonne HPLC (colonne Phényle) en utilisant sur la colonne C-18 un agent d'appariement différent, l'AHFB à la place de l'ATF. L'AHFB permet de former des complexes d'appariements plus hydrophobes et plus encombrants que l'ATF ce qui change le temps de rétention des peptides en relation avec le nombre de groupements positifs, comme ceux des acides aminés basiques. Indépendamment du fait qu'il soit impossible de savoir si l'efficacité de ces changements peut être validée pour des purifications ultérieures d'une même quantité de matériel, nous avons obtenu une excellente purification de peptides, à partir de 400 g de drosophiles adultes entiers, avec seulement quatre étapes de purification en HPLC.

La leucokinine

Cette étude a permis l'isolement et l'identification d'une nouvelle leucokinine chez *Drosophila melanogaster*. La comparaison des extrémités C-terminales des leucokinines isolées chez différents invertébrés permet de constater qu'elles sont toutes conformes à la séquence Phe-X-Y-Trp-Gly-amide, où X peut-être soit une Asn, His, Phe ou Tyr et Y une Pro, Ser, Ala. Cette partie du peptide, appelée peptide "core", est supposée être responsable de l'activité diurétique au niveau des tubes de Malpighi car le fait de tronquer la séquence N-terminale n'élimine pas l'augmentation de l'excrétion de fluide (Coast, 1995). Actuellement, plus de 35 peptides apparentés aux leucokinines ont été identifiés chez un certain nombre d'insectes ; deux peptides ont été isolés chez les crustacés et un chez l'escargot *Lymnaea stagnalis* (Torfs et al., 1999 ; Cox et al., 1997) (Tableau 6).

| | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| Mouche | leucokinine de <i>Drosophila</i> | Asn-Ser-Val-Val-Leu-Gly-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-His-Ser-Trp-Gly-NH₂ | |
| | leucokinine de <i>Musca</i> | Asn-Thr-Val-Val-Leu-Gly-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-His-Ser-Trp-Gly-NH₂ | |
| Moustique | leucokinine I d' <i>Aedes</i> | Asn-Ser-Lys-Tyr-Val-Ser-Lys-Gln-Lys-Phe-Tyr-Ser-Trp-Gly-NH₂ | |
| | leucokinine II d' <i>Aedes</i> | Asn-Pro- Phe-His -Ala-Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine III d' <i>Aedes</i> | Asn-Asn-Pro-Asn-Val- Phe -Tyr-Pro-Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine I de <i>Culex</i> | Asn-Pro- Phe-His-Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine II de <i>Culex</i> | Asn-Asn-Ala-Asn-val- Phe -Tyr-Pro-Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine III de <i>Culex</i> | Thr-Lys-Tyr-Val-Ser-Lys-Gln- Phe -Phe- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| Blatte | leucokinine I de <i>Leucophaea</i> | Asp-Pro-Ala- Phe -Asn- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine II de <i>Leucophaea</i> | Asp-Pro-Gly- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine III de <i>Leucophaea</i> | Asp-Gln-Ala- Phe -Asn- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine IV de <i>Leucophaea</i> | Asp-Ala-Ser- Phe-His-Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine V de <i>Leucophaea</i> | Gly-Ser-Gly- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine VI de <i>Leucophaea</i> | pGlu-Ser-Ser- Phe-His-Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine VII de <i>Leucophaea</i> | Asp-Pro-Ala- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine VIII de <i>Leucophaea</i> | Gly-Ala-Ser- Phe -Tyr- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine I de <i>Periplaneta</i> | Arg-Pro-Ser- Phe -Ala- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine II de <i>Periplaneta</i> | Asp-Ala-Ser- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine III de <i>Periplaneta</i> | Asp-Pro-Ser- Phe -Asn- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine IV de <i>Periplaneta</i> | Gly-Ala-Gln- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine V de <i>Periplaneta</i> | Ser-Pro-Ala- Phe -Asn- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | Criquet | leucokinine de <i>Locusta</i> | Ala- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ |
| | | leucokinine I d' <i>Acheta</i> | Ser-Gly-Ala-Asp- Phe -Tyr-Pro-Trp-Gly-NH ₂ |
| Grillon | leucokinine II d' <i>Acheta</i> | Ala-Tyr- Phe -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine III d' <i>Acheta</i> | Ala-Leu-Pro- Phe -Ser- Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine IV d' <i>Acheta</i> | Asn-Phe-Lys- Phe -Asn-Pro-Trp-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine V d' <i>Acheta</i> | Ala- Phe-His-Ser -Trp-Gly-NH ₂ | |
| | Lépidoptère | leucokinine I de <i>Helicoverpa</i> | Tyr- Phe -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂ |
| leucokinine II de <i>Helicoverpa</i> | | Val- Arg-Phe -Ser-Pro-Trp-Gly-NH ₂ | |
| leucokinine III de <i>Helicoverpa</i> | | Lys -Val-Lys- Phe -Ser-Ala-Trp-Gly-NH ₂ | |
| Crustacés | leucokinine I de <i>Penaeus</i> | Ala-Ser- Phe -Ser-Pro-Tyr-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine II de <i>Penaeus</i> | Asp- Phe -Ser-Ala-Trp-Ala-NH ₂ | |
| | leucokinine III de <i>Penaeus</i> | Pro-Ala- Phe -Ser-Pro-Tyr-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine IV de <i>Penaeus</i> | Val-Ala- Phe -Ser-Pro-Tyr-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine V de <i>Penaeus</i> | pGlu-Ala- Phe -Ser-Pro-Tyr-Gly-NH ₂ | |
| | leucokinine VI de <i>Penaeus</i> | Ala- Phe -Ser-Pro-Tyr-Gly-NH ₂ | |
| Mollusque | leucokinine de <i>Lymnaea</i> | Pro-Ser- Phe -Ser- Ser -Trp-Ser-NH ₂ | |

Tableau 6 : Comparaison de la structure de la leucokinine de drosophile avec celles des autres membres de la famille des leucokinines (les résidus identiques à ceux de la leucokinine de drosophile sont en gras).

Il est à noter que c'est la plus longue leucokinine identifiée avec 15 acides aminés. Ce neuropeptide se démarque également par le fait qu'il n'existe qu'un seul représentant de la famille des leucokinines chez la drosophile, contrairement à ce qui existe dans d'autres espèces (blatte, moustique et autres). Nous n'avons pu isoler qu'un seul peptide et cela nous a initialement surpris. Mais l'existence d'un seul peptide est confirmée par la séquence génomique. Donc, il n'y a plus de doute sur l'existence d'une seule leucokinine chez la drosophile comme cela paraît également être le cas chez la grande mouche *Musca domestica* (Holman et al, 1999).

Nos connaissances sur la physiologie des tubes de Malpighi ont très rapidement progressé et il aurait été possible d'étudier, par l'intermédiaire du modèle de choix que représente la drosophile, les rôles des éventuelles différentes leucokinines. En effet, l'isolement de plusieurs leucokinines chez la drosophile nous aurait aidé à mieux définir l'action de ces neurohormones au niveau des sous-types de cellules épithéliales. De plus, il aurait été intéressant de savoir si elles ont toutes le même effet physiologique que celle identifiée ici ou si elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs différents, comme cela a été suggéré pour les leucokinines de moustique (Veenstra et al., 1997).

L'IFamide

La séquence peptidique de l'IFamide de la mouche *Neobelliera bullata* et celle de la drosophile *Drosophila melanogaster* sont presque identiques. C'est un peptide de 12 acides aminés dont un seul est différent entre les deux espèces, à savoir que l'avant-dernier résidu Leucine de la séquence de la Neb-LFamide est remplacé par une Isoleucine chez la drosophile. Dans le cas de la Neb-LFamide, les auteurs, n'ayant pu obtenir une quantité suffisante pour analyser la séquence par dégradation d'Edman, ont dû déterminer la structure par spectrométrie de masse (Janssen et al., 1996). Cette technique ne permettant pas de différencier une Leucine d'une Isoleucine (les deux acides aminés ont exactement le même poids moléculaire), il n'est pas impossible que pour les deux espèces le neuropeptide soit bien l'IFamide.

La question la plus intéressante est de savoir si ce peptide existe chez d'autres espèces d'insectes. Différentes observations montrent que ce serait le cas. Premièrement, la LFamide a été identifiée à partir de l'essai biologique de contraction des oviductes de criquet, ce qui suggère très fortement la présence de récepteurs spécifiques à la LFamide chez le criquet, une espèce assez éloignée de la mouche. Deuxièmement, on sait que les neuropeptides isolés chez une espèce d'insecte ont été ultérieurement identifiés avec une même forme ou une forme

légèrement modifiée dans d'autres espèces. Il est donc probable que la LFamide existe dans d'autres groupes que les diptères. Troisièmement, l'anti-LFamide reconnaît des cellules neuroendocrines dans le cerveau d'un certain nombre d'insectes : le ver à soie *Bombyx mori*, le criquet migrateur *Locusta migratoria*, la punaise *Rhodnius prolixus*, la blatte américaine *Periplaneta americana*, le grillon *Gryllus bimaculatus* (résultats non montrés). Malgré nos efforts pour isoler des homologues du neuropeptide LFamide chez la blatte *Periplaneta americana*, chez le criquet migrateur *Locusta migratoria* et chez le papillon *Manduca sexta*, nous n'avons pas réussi à purifier de matériel immunoréactif à l'anti-LFamide à l'aide d'un EIA alors que le même anticorps utilisé en immunohistochimie reconnaît des neurones chez ces insectes. Il est possible, toutefois, que les peptides apparentés à la LFamide chez d'autres espèces d'insectes diffèrent trop de la LFamide pour qu'ils soient reconnus dans le dosage immunoenzymatique.

Par l'intermédiaire du séquençage récent du génome du moustique *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002), il a été possible de prédire l'existence d'un peptide très similaire à l'IF et à la LFamide. C'est un peptide qui aurait également une séquence comprenant 12 acides aminés et qui ne diffère du peptide IFamide que par le premier acide aminé, où l'alanine est remplacée par la glycine (Tableau 7).

| | | |
|-----------|-------------------------------|---|
| Mouche | IFamide de <i>Drosophila</i> | Ala-Tyr-Arg-Lys-Pro-Pro-Phe-Asn-Gly-Ser-Ile-Phe-NH₂ |
| | LFamide de <i>Neobelliera</i> | Ala-Tyr-Arg-Lys-Pro-Pro-Phe-Asn-Gly-Ser-Leu-Phe-NH₂ |
| Moustique | IFamide d' <i>Anopheles</i> | Gly-Tyr-Arg-Lys-Pro-Pro-Phe-Asn-Gly-Ser-Ile-Phe-NH₂ |

Tableau 7 : Comparaisons de la structure de l'IFamide de drosophile avec les peptides apparentés (les résidus identiques à ceux de l'IFamide de drosophile sont en gras).

Ces peptides ne présentent aucune similitude de séquence avec les autres familles de peptides présents aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés. Ils sont probablement les membres d'une nouvelle famille présente chez une grande variété d'insecte, avec une séquence consensus C-terminale non définitivement identifiée.

CHAPITRE II

PHYSIOLOGIE DE LA LEUCOKININE

INTRODUCTION

Chez les insectes, le maintien de la composition ionique et de la pression osmotique de l'hémolymphe est assuré de manière stricte. Ce maintien de l'intégrité homéostasique du milieu intérieur est la fonction majeure du système excréteur qui, chez les insectes, est régulé en grande partie par les tubes de Malpighi et l'intestin postérieur. Les tubes de Malpighi filtrent l'hémolymphe et excrètent un liquide qui est souvent comparé à de l'urine primaire chez les vertébrés. Ce liquide passe dans l'intestin et suivant l'état d'hydratation de l'insecte, l'urine peut soit entrer dans l'intestin moyen (Dow, 1984), soit dans l'intestin postérieur. Puis au niveau du rectum, il y a une réabsorption sélective d'ions, de nutriments et d'eau (Maddrell, 1986) (Figure 22).

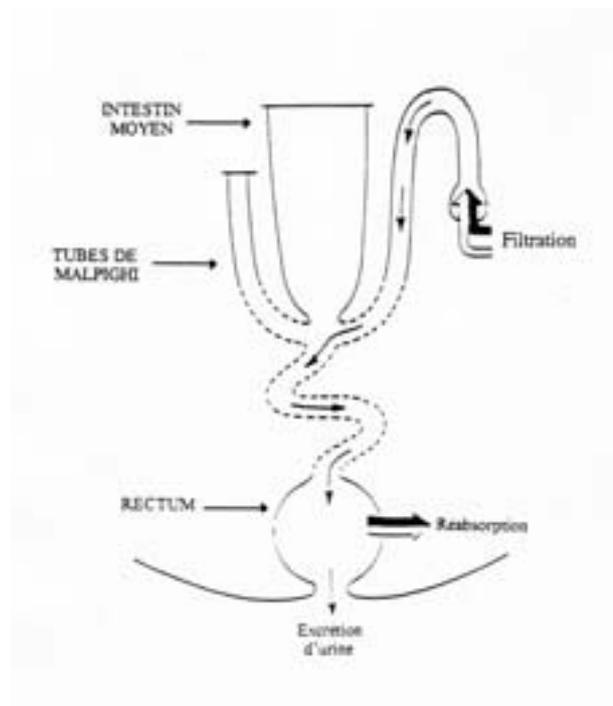


Figure 22 : Schéma de l'excrétion urinaire réalisée au niveau des tubes de Malpighi et de la réabsorption au niveau du rectum.

Ces processus sont sous la dépendance d'un contrôle neuroendocrine exercé par des neuropeptides qualifiés d'hormones diurétiques et anti-diurétiques qui stimulent respectivement l'excrétion de fluide par les tubes de Malpighi, et la réabsorption de fluide par l'intestin postérieur.

Un certain nombre de neuropeptides, augmentant le taux d'excrétion de fluide par les tubes de Malpighi, ont été caractérisées chez différentes espèces d'insectes (Phillips et al., 1995 ; Coast 1995). Trois groupes de peptides diurétiques paraissent être généralement présents chez les insectes : celui des peptides apparentés au CRF, facteur de libération de la corticotropine chez les vertébrés (Kataoka et al., 1989 ; Clottens et al., 1994 ; Audsley et al., 1995), celui des peptides apparentés à la calcitonine (Furuya et al., 2000 ; Coast et al., 2001) et celui des peptides apparentés aux leucokinines (Holman et al., 1984 ; Coast, 1995). Chez la drosophile, on connaît un quatrième type de peptides diurétiques : les peptides apparentés à l'hormone des lépidoptères CAP-2b (Huesmann et al., 1995 ; Davies et al., 1995). Bien que ces peptides soient généralement présents chez les insectes, ils ne sont pas tous diurétiques (Quinlan et al., 1997).

L'activité biologique originelle identifiée pour les leucokinines est l'augmentation des contractions musculaires spontanées de l'intestin postérieur chez la blatte *Leucophaea maderaea* (Holman et al., 1984). Plus tard, il a été montré que les leucokinines induisent également l'excrétion de fluide au niveau des tubes de Malpighi de nombreux insectes (Hayes et al., 1989 ; Coast et al., 1995 ; Veenstra et al., 1997).

Jusqu'à ce travail, aucun membre de la famille des leucokinines n'avait été identifié chez la drosophile. Pourtant, les tubes de Malpighi de drosophile offrent un excellent modèle pour l'étude des fonctions épithéliales du fait de leur structure simple et également des processus de transport membranaire (Dow et Davies, 2001). En effet, le segment principal des tubes de Malpighi, considéré comme le seul capable d'excréter de l'urine, est constitué de deux types de cellules épithéliales contrôlant séparément les transports d'ions (O'Donnell et al., 1996) : les cellules principales sont le lieu du transport actif de cations tandis que les cellules étoilées paraissent être impliquées uniquement dans le mouvement passif d'anions et de flux d'eau (O'Donnell et al., 1998). Les neurohormones contrôlent l'excrétion d'urine au niveau de ces cellules épithéliales par l'intermédiaire de différents seconds messagers. Des travaux antérieurs réalisés chez la drosophile avaient suggéré que les leucokinines agiraient au niveau des cellules étoilées via le calcium intracellulaire pour augmenter la conductance chlorure et ainsi agir sur l'excrétion de fluide (O'Donnell et al., 1998). Les tubes de Malpighi permettent également l'étude *in vitro* des mécanismes de signalisation intracellulaire.

Après avoir identifié le seul membre de la famille des leucokinines chez la drosophile (Chapitre1), nous avons entrepris d'étudier le rôle physiologique de ce neuropeptide. Ces expériences de physiologie ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr J. A. T. Dow du département de Génétique à l'Université de Glasgow. Dans une première expérience, nous

avons montré l'activité diurétique de la leucokinine de drosophile au niveau des tubes de Malpighi isolés, puis nous avons vérifié que le calcium intervient dans la voie de signalisation intracellulaire de la leucokinine.

RESULTATS

I- Mesure de l'excrétion de fluide par des tubes de Malpighi isolés

Les expériences de physiologie ont été réalisées sur des tubes de Malpighi isolés d'adultes femelles. Peu de temps après l'addition du peptide à la concentration de 1 nM, le peptide leucokinine produit clairement une stimulation de l'excrétion de fluide avec un profil de réponse similaire à celui observé pour les autres leucokinines. Le tube de Malpighi répond de façon maximale dans l'intervalle de temps de mesure de 10 min et le niveau d'augmentation d'excrétion de fluide reste soutenu pendant de nombreuses minutes (Figure 23). L'augmentation de l'excrétion de fluide est approximativement de 2-3 nl/min ce qui est comparable aux valeurs obtenues sur les tubes de Malpighi de la drosophile avec les leucokinines identifiées chez d'autres espèces.

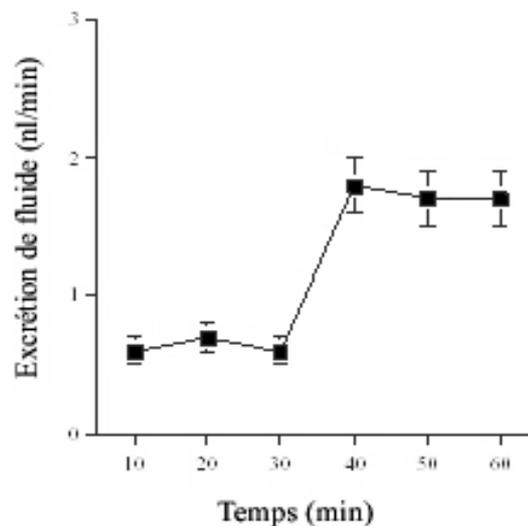


Figure 23 : Effet de la leucokinine de drosophile sur l'excrétion de fluide pour un tube de Malpighi isolé. Cette figure montre une réponse typique de l'excrétion de fluide après addition à 30 min d'une concentration de 10^{-9} mol/l de leucokinine de drosophile ; les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM. $N > 10$ tubes.

Différentes concentrations de la leucokinine de drosophile ont été testées et une courbe dose-réponse a été réalisée (Figure 24).

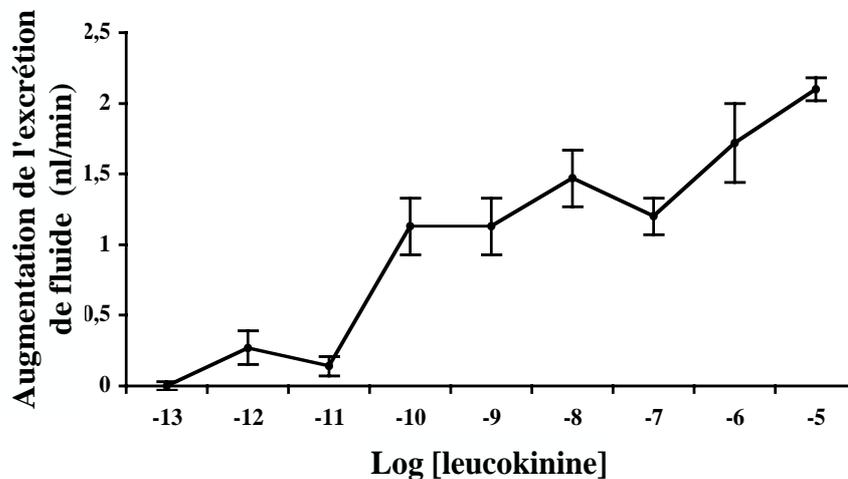


Figure 24 : Augmentation de l'excrétion de fluide induite en fonction de la concentration de leucokinine appliquée sur des tubes de Malpighi isolés ; les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM. $N > 10$ tubes.

On peut constater une augmentation de l'excrétion de fluide au niveau du tube de Malpighi après administration d'une dose de 0,1 nM de leucokinine, concentration considérée comme physiologique. L'augmentation de l'excrétion est significative pour les concentrations de 10^{-10} à 10^{-5} M avec un risque d'erreur de $p < 0,05$ selon le test " t " de student.

La valeur moyenne de l'augmentation de l'excrétion de fluide obtenue par des tubes isolés est de 1,5 nl/min ce qui correspondrait à une augmentation de 6 nl/min pour les deux paires de tubes de Malpighi.

II- Mesure du calcium intracellulaire dans les cellules principales et étoilées

Les mesures de calcium intracellulaire sont réalisées dans les tubes de Malpighi provenant de cinq adultes femelles. Les tubes contenant les tissus sont additionnés de cœlentérazine pour permettre la constitution de l'æquorine et laissés en incubation à l'obscurité pendant 4 à 6 heures. Avant chaque application du peptide, une injection de milieu de Schneider est réalisée pour nous permettre d'évaluer le bruit de fond de la luminescence de l'æquorine. Les valeurs de la variation de concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) sont déterminées par la différence entre les $[Ca^{2+}]_i$ des échantillons stimulés par la leucokinine et celles des témoins. Les résultats montrent que les niveaux de calcium dans les

cellules étoilées augmentent rapidement après application de la leucokinine et ceci pour une valeur de 1 nM (Figure 25).

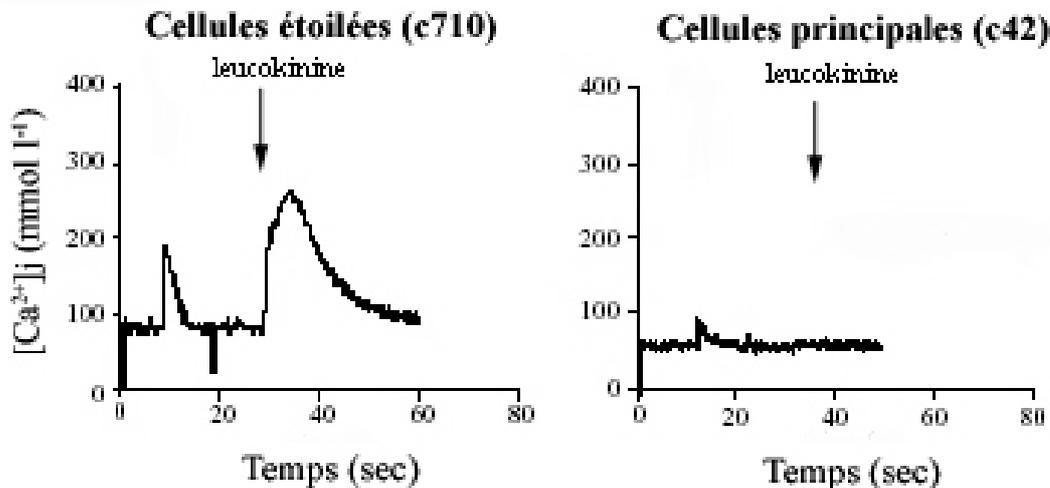


Figure 25 : La leucokinine de drosophile entraîne une augmentation, en moins de 100 ms, de $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules étoilées. Tracé typique de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules étoilées (à gauche) et principales (à droite) après une injection de tampon salin contenant 10 nM de leucokinine (flèche).

Donc nous montrons que la leucokinine de drosophile produit une élévation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules étoilées, comme cela a été reporté pour d'autres leucokinines. Cependant, la leucokinine de drosophile entraîne une réponse rapide dans les 100 ms après l'injection, mais transitoire car suivie par une plus lente augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Cette " vague " plus lente de Ca^{2+} atteint un pic maximal après 3 s d'injection, puis diminue dans les 10 à 20 s qui suivent pour revenir à un niveau de base.

Ainsi, une augmentation approximative de 200 nM de $[Ca^{2+}]_i$ cytosolique au-dessus du niveau du seuil au repos de 70 nM concorde avec les données qui ont été préalablement rapportées pour les peptides non natifs de la drosophile (O'Donnell et al., 1998).

Par contre, dans les cellules principales, la leucokinine n'a pas d'effet comme le montre le tracé ci-dessus, même pour des concentrations de 10^{-6} M.

DISCUSSION

Nous avons souligné en introduction que l'activité biologique originelle identifiée pour les leucokinines est l'augmentation des contractions musculaires de l'intestin postérieur chez la blatte *Leucophaea maderaea*. Nos observations préliminaires confirment que la leucokinine augmente également les contractions spontanées de l'intestin postérieur chez la drosophile. Bien que ces peptides aient été identifiées pour leur activité myotropique, l'intérêt pour les leucokinines s'est actuellement porté sur leurs actions diurétiques sur les tubes de Malpighi. Nous avons confirmé que l'excrétion de fluide est augmentée par la leucokinine de drosophile et que ce peptide est le plus puissant stimulant de l'excrétion de fluide jamais encore identifié dans cette espèce. En effet, il produit une augmentation rapide et soutenue du taux d'excrétion de fluide de deux nl/min par tube de Malpighi avec une EC_{50} approximative de 0,1 nM. La faiblesse de cette concentration suggère que la leucokinine de drosophile est le ligand authentique pour les récepteurs des tubes de Malpighi. En effet la plupart des neurohormones agissent à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-11} M.

Chez la drosophile, grâce à l'expression ciblée d'apoæquorine, il est possible de mesurer les concentrations de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans les différents types de cellules des tubes de Malpighi (Rosay et al., 1997, Sözen et al., 1997). Dans ce travail, réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr J. A. T. Dow de l'Université de Glasgow, nous avons également étudié l'effet du peptide naturel de drosophile sur les $[Ca^{2+}]_i$ dans les deux types principaux de cellules des tubes de Malpighi : les cellules principales et les cellules étoilées.

Les effets de la leucokinine de drosophile sur les $[Ca^{2+}]_i$ sont conformes à ceux obtenus dans des études préalablement publiées (O'Donnell et al., 1996 ; Rosay et al., 1997) : les sites d'actions de la leucokinine de drosophile sont les cellules étoilées et il n'y a pas d'effet sur les cellules principales. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par la leucokinine atteint un pic excédant 200 nM dans un intervalle de temps de 100 ms. Ensuite, les taux de Ca^{2+} reviennent à leur niveau de base approximativement 20 sec après l'application du peptide. Les effets sur l'excrétion de fluide persistent pendant au moins 30 min ce qui suggère que la signalisation calcique déclenche l'activation d'autres mécanismes cellulaires se poursuivant à plus long terme.

Il a été montré, chez le moustique *Aedes aegypti*, que les leucokinines induisent l'hydrolyse des phosphatidylinositols entraînant la production d'inositol triphosphate (IP3) (Cady et Hagedorn, 1997). Du fait de la forte similarité morphologique et physiologique des

tubes de Malpighi de ce diptère avec ceux de la drosophile, on peut penser que les mécanismes de signalisation de l'excrétion de fluide sont également similaires et l'augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules étoilées pourrait être un effet indirect de la production d'IP3. La leucokinine n'augmentant pas les concentrations d'AMPc, ni celles de GMPc par ailleurs (Terhzaz et al., 1999), cela indique que la leucokinine agit uniquement sur les cellules étoilées.

Un récepteur à sept domaines transmembranaires a été cloné à partir du système nerveux du mollusque *Lymnaea stagnalis* (Cox et al., 1997). Son ligand a été isolé et identifié comme un peptide apparenté aux leucokinines, la lymnokinine (Tableau 6). La lymnokinine augmente également la concentration de calcium intracellulaire dans des cellules CHO transfectées avec son récepteur, confirmant ainsi que la réponse fonctionnelle des leucokinines est associée à une augmentation du calcium intracellulaire. Une séquence de drosophile homologue au récepteur de la lymnokinine a été exprimée avec le transgène pour le rapporteur calcique (aequorine) dans les cellules S2 ce qui a permis de confirmer que la séquence est bien celle qui code le récepteur de la leucokinine chez la drosophile. Des anticorps dirigés contre le récepteur identifié montrent l'immunoréactivité dans les cellules étoilées des tubes de Malpighi (Radford et al., 2002).

L'effet maximal de la leucokinine identifiée ici sur l'excrétion de fluide (2 nl/min) est moyen comparé à celui qui est induit par des extraits de tête ou par ceux du ganglion abdominal fusionné (4 nl/min) (Dow et al., 1994). La leucokinine n'est donc pas la seule hormone diurétique. En effet, chez la drosophile, il y a quatre gènes codant des précurseurs d'hormones diurétiques (HD) potentielles. Outre la leucokinine, il y a le peptide apparenté au facteur de libération corticotropique (CRF ou HD I) (Kataoka et al., 1989 ; Clottens et al., 1994, Cabrero et al., 2002), le peptide apparenté à la calcitonine ou HD II (Furuya et al., 2000 ; Coast et al., 2001) et les peptides apparentés au CAP2b de *Manduca sexta*, nommés capa-1 et capa-2 (Davies et al., 1995 ; Kean et al., 2002).

De toutes ces hormones diurétiques, la leucokinine est la plus puissante avec une augmentation significative du taux d'excrétion de fluide chez la drosophile à une concentration de 0,1 nM tandis que l'HD I, HD II et capa-1 et capa-2 augmentent significativement le taux d'excrétion de fluide seulement pour des concentrations de 1 nM et plus (Tableau 8).

| <i>Hormones diurétiques</i> | <i>Concentration effective EC₅₀</i> |
|---|--|
| <i>Leucokinine</i> | 10 ⁻¹⁰ M |
| <i>Peptide apparenté au CRF</i> | 10 ⁻⁷ M |
| <i>Peptide apparenté à la calcitonine</i> | 4,3 10 ⁻⁹ M |
| <i>Peptides apparentés au Cap2b</i> | 10 ⁻⁷ |

Tableau 8 : Valeurs des EC₅₀ des différentes hormones diurétiques chez la drosophile

Les sites d'action et la signalisation intracellulaire des hormones diurétiques sur les tubes de Malpighi sont connus chez la drosophile. Les hormones diurétiques HD I, HD II, capa-1 et capa-2 agissent toutes sur les cellules principales, alors que la leucokinine agit uniquement sur les cellules étoilées.

Les hormones diurétiques I et II stimulent l'AMPC intracellulaire et augmentent le potentiel épithélial dans les tubes de Malpighi, suggérant qu'elles agissent sur les cellules principales (Cabrero et al., 2002 ; Coast et al., 2001). Les homologues de CAP2b chez la drosophile, capa-1 et capa-2, agissent également au niveau des cellules principales et stimulent le transport de fluide par les tubes de Malpighi en élevant les niveaux de GMPc avec implication du monoxyde d'azote (NO) et du calcium (Davies et al., 1995 ; 1997 ; Rosay et al., 1997 ; Kean et al., 2001). Il est intéressant de noter que ces hormones diurétiques agissent toutes sur les cellules principales, cellules où l'on trouve la V-ATPase responsable du transport actif des ions, et donc indirectement de l'excrétion de fluide. Par contre, il a été proposé que les leucokinines augmentent la conductance chlorure et cela uniquement au niveau des cellules étoilées des tubes de Malpighi par l'intermédiaire du calcium intracellulaire, ce qui permettrait le flux passif d'eau grâce aux aquaporines (Dow et al, 1994 ; O'Donnell et al., 1998).

La différence du mode d'action des hormones diurétiques au niveau des sous-types de cellules dans les tubes de Malpighi suggère la possibilité d'action synergique entre la leucokinine et les autres hormones diurétiques (Coast, 1995). De tels effets synergiques sur l'excrétion de fluide ont été décrits pour les leucokinines et l'hormone diurétique HD II chez la drosophile (Coast et al., 2001) et également pour l'hormone diurétique HD I et la leucokinine chez le criquet (Thompson et al, 1998). De plus, puisque les hormones diurétiques HD I et HD II augmentent l'AMPC intracellulaire, il est possible qu'elles agissent de façon synergique mais cela reste à démontrer chez la drosophile.

Bien que, chez différentes espèces d'insectes, la leucokinine soit co-localisée avec l'hormone diurétique HD I dans certaines cellules neuroendocrines (Chen et al., 1994 ;

Thompson et al., 1998 ; Te Brugge et al., 2001), cela n'est pas le cas chez la drosophile. Néanmoins, chez cette espèce, on a observé que les cellules neuroendocrines qui produisent l'hormone diurétique HD I ainsi que leurs terminaisons axonales neurohémales expriment également le récepteur de la leucokinine (Cabrero et al., 2002), ce qui suggère que la libération de leucokinine dans l'hémolymphe pourrait stimuler la libération de l'hormone diurétique HD I.

Bien que nous ayons bien argumenté les effets de la leucokinine sur la physiologie des tubes de Malpighi chez la drosophile, il est probable que sa fonction soit plus complexe. En effet, cette neurohormone est produite non seulement dans des cellules neuroendocrines mais également dans des interneurons (Cantera et Nässel, 1992) et le récepteur de la leucokinine est exprimé dans plusieurs neurones localisés dans le système nerveux. Ces observations indiquent clairement une fonction centrale de ce neuropeptide, mais actuellement, nous ignorons totalement laquelle. Finalement, la présence de récepteurs fonctionnels de la leucokinine dans les gonades mâles et femelles (Radford et al., 2002), démontre que nous avons encore beaucoup à apprendre concernant le(s) rôle (s) physiologique(s) de la leucokinine.

CHAPITRE III

PHYSIOLOGIE DE L'IFAMIDE

INTRODUCTION

Après avoir identifié l'IFamide chez la drosophile, nous avons voulu déterminer son rôle physiologique. Notre hypothèse de départ était que ce peptide pourrait stimuler les contractions de l'oviducte chez la drosophile comme cela a été démontré chez le criquet migrateur (Janssen et al., 1996). Néanmoins, l'analyse immunohistologique a montré que ce peptide n'est présent dans aucun axone innervant directement l'oviducte, ni dans aucune terminaison neuroendocrine se projetant en dehors du système nerveux. Nous avons donc pensé qu'il est improbable que le peptide soit libéré dans l'hémolymphe. Ainsi, puisque le neuropeptide reste confiné à l'intérieur du système nerveux, et afin de découvrir la ou les fonctions de l'IFamide, nous avons réalisé l'ablation génétique des neurones exprimant ce neuropeptide en utilisant le système d'expression UAS_G-Gal4 (Brand et Perrimon, 1993).

Des drosophiles dépourvues des quatre neurones produisant le neuropeptide IFamide ont été ainsi obtenues. Les mâles montrent un comportement sexuel aberrant, ce qui nous a incités à conduire une étude plus approfondie du comportement de ces mâles.

Il est nécessaire d'explicitier, au préalable, le comportement sexuel de la drosophile.

1- La parade amoureuse (PA) chez la drosophile

La parade amoureuse chez la drosophile est un comportement riche en événements. Il n'est donc pas surprenant que cela soit un des comportements les plus étudiés. Le comportement sexuel des mâles est défini par un rituel de cour complexe correspondant à une succession d'actions prédéterminées et invariables (Figure 26). Les femelles réceptives répondent à cette parade amoureuse en permettant la copulation et ensuite l'oviposition des œufs (Hall, 1994).

Quand un mâle sauvage est présenté à une femelle vierge réceptive, il s'oriente dans sa direction et la suit (A). Après la poursuite, comportement appelé "tracking" dans la littérature, le mâle s'approche de la femelle et tapote son abdomen avec ses pattes avant munies de leurs peignes sexuels (afin de s'assurer qu'elle est bien de la même espèce) (B). Après la phase de tapotement, le mâle étend l'une des deux ailes perpendiculairement à son corps et la fait vibrer. Ces vibrations produisent deux types distincts de sons ; le son "pulse" et le son "sine" qui sont répétés plusieurs fois en une seule séquence et qui forment le chant amoureux (C). En réponse à ce chant, les femelles réduisent leur locomotion et s'arrêtent indiquant une augmentation de leur réceptivité. Ensuite le mâle se positionne derrière la

femelle immobilisée, fait ressortir son proboscis et lèche les parties génitales de la femelle (D) qui fait ressortir à son tour son ovipositeur. Cette étape permet des échanges de signaux tactiles et/ou chimiques entre le mâle et la femelle. Immédiatement, le mâle essaie de copuler ce qui est visible par la courbure de son abdomen (E). Quand la femelle est réceptive, elle étend ses ailes latéralement, ouvre sa plaque vaginale et permet au mâle de se positionner sur son dos en s'accrochant à l'aide de ses peignes sexuels. Deux partenaires normaux réussissent l'accouplement avec un taux de plus de 90% (F). Après une copulation qui dure environ 20 minutes chez *Drosophila melanogaster*, le mâle se retire. La même femelle pourra éventuellement recouvrer de nouveau sa réceptivité 8 à 10 jours après la première copulation.

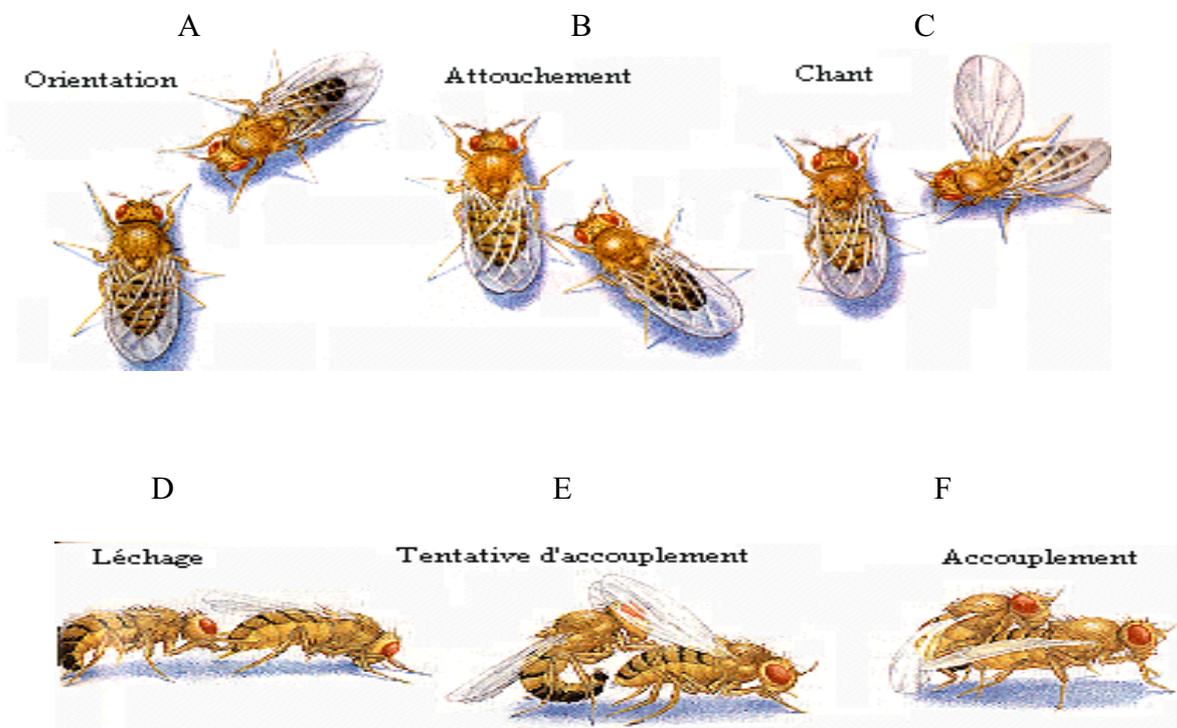


Figure 26 : Schéma récapitulant les différentes étapes de la parade amoureuse chez *Drosophila melanogaster* (source : <http://quasimodo.versailles.inra.fr/inapg/drosoZone/Default.html>, adapté de Greenspan et Ferveur, 2000).

2- Modalités sensorielles impliquées dans la PA

Quand un mâle sauvage naïf est présenté à une femelle vierge réceptive, il commence à la courtiser. Ce comportement de cour peut être quantifié par un index de cour (IC) et par un paramètre d'appel sexuel (SAP) et ceci pour un temps donné. L'IC correspond au temps (exprimé en pourcentage) que le mâle passe à courtiser la femelle en incluant les différentes étapes successives de cour : l'orientation, la poursuite, le tapotement, le léchage, l'extension des ailes et les tentatives de copulation (Siegel et Hall, 1979). Le paramètre appelé SAP correspond au temps pendant lequel le mâle réalise l'extension d'une de ses ailes avec un angle de 45 à 90° par rapport à son corps. Ainsi, en temps normal, quand un mâle sauvage courtise une femelle vierge, son index de cour est environ de 85 % et son SAP environ de 30%. Par contre, des mâles ou des femelles dont la perception ou la production de signaux visuels, olfactifs ou auditifs sont perturbées, s'accouplent de façon plus problématique avec un index de cour diminué (Tompkins, 1984).

Il a été montré que la drosophile peut s'accoupler dans le noir mais le temps mis pour arriver jusqu'à la copulation est significativement plus long qu'à la lumière (Cobb, Ferveur 1996 ; Markow 1975). De façon plus marquée, des mâles mutants (*glass*) qui ont des défauts de vision ou des mâles qui, portant la mutation *white*, sont aveugles, ont tendance à mal s'orienter par rapport à la femelle, ce qui peut résulter en l'arrêt des différentes séquences de cour et entraîner l'échec de la parade amoureuse. Les femelles mutantes, quant à elles, mettent plus de temps pour arriver jusqu'à la copulation. On peut donc noter que les signaux visuels sont importants pour la reconnaissance du partenaire sexuel.

Un mâle qui porte les mutations *smellblind* et *glass* et qui, en conséquence est dépourvu d'olfaction et de vision, a un IC de seulement 5% (Tompkins, 1984). En ce qui concerne les femelles mutantes, elles ne s'immobilisent pas suffisamment longtemps pour permettre aux mâles de se positionner derrière elles ce qui rend la copulation difficile.

Lorsque des mâles, dont les ailes ont été préalablement coupées, sont présentés à des femelles vierges à l'obscurité (entraînant la suppression des modalités auditives et visuelles), ils s'accouplent dans la majorité des essais. Cependant, quand les mâles et les femelles portent en plus la mutation *olfactory D* (entraînant la suppression des modalités olfactives), seulement 6% des paires s'accouplent (Gailey et al., 1996).

Ces études sur des mutants déficients au niveau sensoriel montrent l'importance et la nécessité de convergence des différentes modalités sensorielles (visuelles, auditives, olfactives) pour permettre un comportement de cour normal.

3- Déterminisme génétique, environnemental et apprentissage de la PA

Tout le répertoire du comportement de cour peut être réalisé sans l'apprentissage parental ou l'entraînement par ses propres congénères. En effet lorsqu'un œuf fertilisé de drosophile est prélevé avant l'éclosion et isolé pendant tout son développement, la mouche qui en résulte est capable de copuler et d'exécuter le répertoire entier du comportement de cour. Ainsi, le fait que les mâles aient la capacité de réaliser la PA et les femelles d'y répondre, montre que le comportement de cour est génétiquement déterminé. Il est donc intéressant d'analyser comment des gènes peuvent influencer un comportement stéréotypé et élaboré (Hall, 1994).

Bien que le comportement et l'orientation sexuels soient déterminés génétiquement, la discrimination et la vigueur sexuelle des mâles sont affectées par des facteurs environnementaux et l'expérience. Par exemple, des jeunes mâles qui ont été préalablement courtisés par des mâles âgés s'accouplent plus vite que des mâles isolés pendant leur développement (McRobert et Tompkins, 1988). De la même façon, des mâles sauvages hétérosexuels, exposés à un environnement de cour homosexuelle, se mettent activement à courtiser des mâles (Zhang et Odenwald, 1995).

La discrimination et la vigueur sexuelle des mâles sont également modifiées par l'expérience. Quand un mâle courtise un mâle sauvage, celui-ci répond fréquemment par un mouvement de cisaillement de ses deux ailes entraînant la production d'un son qui fonctionne comme un signal de répulsion et ainsi réduit considérablement, voire arrête, les interactions entre mâles. Le rôle de l'apprentissage dans le comportement de cour est bien connu, et c'est pour cette raison qu'on utilise uniquement des mâles isolés depuis leur éclosion, appelés mâles naïfs pour les expériences de cour. Un mâle naïf confiné dans une chambre d'accouplement avec une femelle non réceptive, car déjà fécondée, va ensuite réaliser un comportement de cour moins intense vis-à-vis de sa prochaine partenaire sexuelle même si celle-ci est vierge et réceptive (Siegel et Hall, 1979 ; Gailey et al., 1984). Des mâles possédant des mutations empêchant l'apprentissage et/ou la mémorisation (mutants *amnesiac*) n'arrivent plus à modifier leur comportement par rapport à des précédentes expériences sexuelles et, entre autre, ne discriminent plus l'état sexuel des nouvelles partenaires présentées ultérieurement (Siegel et Hall, 1979). En général, la possibilité d'apprendre de ses propres expériences sexuelles permet aux mâles de développer un comportement de parade amoureuse plus efficace (Hall, 1986 ; Greenspan, 1995).

4- Localisation des centres neuronaux responsables de la PA

Étant donné que la détermination sexuelle se fait de façon autonome dans chaque cellule chez la drosophile, il est possible d'avoir des gynandromorphes c'est-à-dire des individus qui se présentent comme une mosaïque des deux sexes, dans lesquels certaines cellules sont génétiquement mâles, d'autres génétiquement femelles. L'analyse de ces mosaïques sexuelles a permis de localiser les régions du cerveau responsables du comportement de cour chez le mâle et la femelle (Hall, 1979). Les résultats montrent que chez le mâle, c'est la région postérieure dorsale du cerveau et les ganglions thoraco-abdominaux qui sont impliqués. Les structures contrôlant le comportement de tapotement, de poursuite, d'extension de l'aile et le léchage des parties génitales paraissent être situées dans le cortex postérieur du cerveau dorsal. Les régions responsables du chant amoureux et des tentatives de copulation sont localisées dans les ganglions thoraco-abdominaux. Les études de gynandromorphes ont montré que la région essentielle pour la détermination du comportement sexuel femelle est la région antérieure dorsale du cerveau.

Donc le centre cérébral responsable du comportement de cour caractéristique du mâle paraît distinct de celui de la femelle. Ainsi l'existence d'un comportement différent entre les mâles et les femelles est confirmée par un dimorphisme sexuel des régions du cerveau responsables de ce comportement de cour.

L'identité de la partie postérieure dorsale du cerveau impliquée dans un déterminisme sexuel adéquat n'a pas été déterminée plus précisément, néanmoins l'implication des corps pédonculés a été postulée (Heisenberg et al., 1995). Les corps pédonculés paraissent jouer des rôles importants dans la mémorisation et l'apprentissage en traitant et intégrant les informations sensorielles et particulièrement celles provenant du neuropile olfactif primaire, les lobes antennaires (Stocker, 1994 ; Zars, 2000). Du fait que la reconnaissance des phéromones femelles soit un facteur important pour l'accouplement (Jallon, J-M, 1984 ; Ferveur et al., 1997), il paraît probable que les corps pédonculés jouent un rôle dans le contrôle du comportement de cour.

Des mosaïques sexuelles peuvent aussi être générées génétiquement par expression de la forme femelle du facteur de transcription *transformer* (*tra*) en utilisant le système UAS_G-Gal4. Ce facteur de détermination sexuelle induit la féminisation des cellules qui l'expriment et l'on a observé que les mâles deviennent bisexuels car ils courtisent aussi bien les mâles que les femelles, lorsque *tra* est exprimé plus ou moins spécifiquement dans les corps pédonculés et/ou les lobes antennaires (Ferveur et al., 1995 ; 1997 ; O'Dell et al., 1995 ; Ferveur et Greenspan, 1998, An et al., 2000).

Étant donné que les lobes antennaires sont le centre relais primaire de l'information olfactive à partir des antennes jusqu'aux corps pédonculés, ces résultats paraissent confirmer l'importance du traitement de l'information olfactive dans la discrimination mâle-femelle. Kido et Ito (2002) ont récemment montré que les corps pédonculés et les lobes antennaires ne joueraient pas un rôle critique dans le contrôle du comportement de cour, et qu'en conséquence, d'autres régions du protocerebrum seraient critiques pour cette fonction cérébrale. En effet, par traitement des larves à l'hydroxyurée, ce qui réalise l'ablation chimique des neuroblastes générant les neurones des corps pédonculés, ces auteurs montrent que ni l'absence du comportement sexuel, ni le comportement bisexuel causé par l'expression de *tra* dans les mêmes lignées Gal4 ne change. Cependant, même si les corps pédonculés ne sont pas nécessaires pour la détermination d'un phénotype de cour hétérosexuel ou bisexuel, ces structures ont clairement un effet sur le degré d'activité de cour et ne sont donc pas sans importance pour le comportement de cour considéré dans sa globalité.

Bien qu'il ait été montré que les circuits olfactifs et les sites de traitement des informations olfactives tels que la corne latérale du protocerebrum ne soient pas affectés par le traitement à l'hydroxyurée (Heimbeck et al., 2001), l'expression du transgène codant la toxine tétanique provoquant la mort de la majorité des neurones de cette région du cerveau, entraîne une forte diminution du comportement de cour. Ainsi, Kido et Ito suggèrent que, non seulement des neurones de la corne latérale mais également des neurones d'autres régions du cerveau en aval de la corne latérale, joueraient un rôle décisif dans le contrôle du comportement sexuel du mâle. Les régions protocérébrales comme les corps pédonculés, les lobes antennaires ou le complexe central auraient un rôle secondaire.

En résumé, on peut dire que des incertitudes demeurent quant à l'exacte nature des « centres neuronaux » responsables du comportement de cour et que cela est en grande partie, dû au manque d'informations sur l'anatomie et la physiologie des connexions neuronales dans le cerveau de la drosophile.

5- Mâles mutants avec un comportement sexuel aberrant

En condition normale, les mâles sauvages ne se courtisent pas mutuellement. En effet, la production de phéromones anti-aphrodisiaques ainsi que le signal de répulsion en réponse à des avances sexuelles suppriment la cour entre mâles. De plus, ce comportement est renforcé par l'expérience avec l'apprentissage de la cour chez les mâles immatures ce qui réduit considérablement le niveau d'interaction sexuelle mâle-mâle. Néanmoins, on constate que les mâles sauvages matures courtisent vigoureusement des mâles génétiquement normaux qui ont

moins de 12 heures (Gailey, 1982). Les composés attirant ces mâles, secrétés par les mâles immatures, sont un mélange spécifique de phéromones, qui disparaissent rapidement après l'éclosion (Tompkins, 1984).

La génétique classique a permis de générer plusieurs mutants dont le comportement de cour est perturbé. La plupart d'entre eux ont des déficits sensoriels entraînant des préférences sexuelles anormales. Cette approche a permis l'identification de gènes spécifiques impliqués dans la perception ou le traitement sensoriels plutôt que des gènes directement responsables du comportement sexuel (Hall, 1994). Néanmoins, chez d'autres mutants, l'orientation homosexuelle ou bisexuelle est due à des mutations de gènes ayant des fonctions plus fondamentales (Gill, 1963 ; Yamamoto et Nakano, 1999).

Ces mâles bisexuels réalisent le comportement de chaining, c'est-à-dire qu'ils se courtisent entre eux et un index de chaining (ICh) peut être déterminé. Cet index représente le temps que les mâles passent à se faire la cour en groupe en formant des chaînes lorsqu'on les réunit. Une chaîne est généralement définie comme un groupe interactif d'au moins trois mâles sur les huit placés dans la coupelle. Les mâles homo- et bisexuels se courtisent les uns les autres en se positionnant selon différentes figures géométriques (Figure 27).

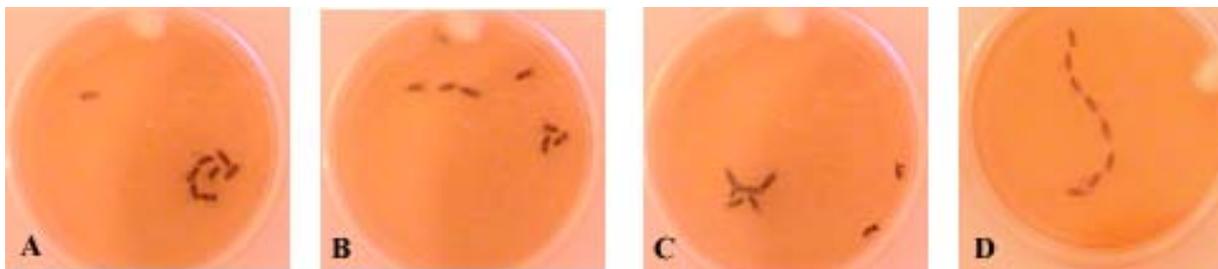


Figure 27 : Photos montrant le comportement de chaining de mâles mutants *fruitless* dans nos chambres d'accouplement, réalisant différentes formes géométriques : (A) en cercle, (B) en triangle, (C) en mêlée et (D) en ligne.

Par exemple les mutations du gène *fruitless* (*fru*, Ito et al., 1996 ; Ryner et al., 1996), ont des effets importants sur la préférence sexuelle des mâles et entraînent un comportement de cour mâle-mâle. Les mâles *fru* courtisent mal, ne chantent pas, ne réalisent pas de tentatives de copulation et s'ils arrivent à copuler, des problèmes d'éjaculations s'ensuivent (Gailey et Hall, 1989 ; Villella et al., 1997 ; Goodwin et al., 2000 ; Lee et al., 2001). Ce dernier comportement explique leur stérilité d'où leur nom, *fruitless*. Morphologiquement, les mâles *fru* sont normaux à l'exception d'un muscle présent au niveau du cinquième segment abdominal spécifique aux mâles adultes, appelé muscle de Lawrence qui est formé incomplètement ou absent. Cependant, l'absence de cette structure chez les mâles *fru* n'est

pas la cause de leur stérilité car des mâles dépourvus du muscle de Lawrence sont fertiles (Lawrence et Johnston, 1986 ; Gailey et al., 1991, Villella et al., 1997, Anand et al., 2001). Par contre, les femelles *fruitless* ne paraissent pas être affectées pas cette mutation (Villella et al., 1997). Différents transcrits spécifiques au sexe proviennent du gène *fru* et sont précisément exprimés dans des sous-ensembles de neurones centraux (Lee et al., 2000). Les neurones exprimant *fru* sont localisés dans plusieurs régions du cerveau potentiellement impliquées dans la discrimination sexuelle des mâles, telles que les corps pédonculés, les lobes antennaires, et le ganglion sous-œsophagien dont les deux dernières régions reçoivent respectivement les afférences olfactives antennaires et les projections gustatives.

Un deuxième gène impliqué dans le comportement sexuel, appelé *dissatisfaction* (*dsf*) a été décrit par Finley et al., 1997 ; 1998. Comme les mutants *fru*, les mâles mutants *dsf* montrent un comportement bisexuel et arrivent difficilement à réaliser des tentatives de copulation car ils ont des difficultés à courber leur abdomen. En effet, chez ces mâles mutants, la morphologie des muscles (muscle de Lawrence) est normale, mais c'est l'innervation des muscles ventraux au niveau du cinquième segment abdominal qui est anormale. Ces mâles initient la cour aux femelles, mais seulement une petite fraction arrive à copuler. En ce qui concerne les femelles mutantes *dsf*, elles rejettent les mâles. De plus, les muscles de leur utérus n'étant pas innervés par les neurones moteurs, elles sont incapables de pondre leurs œufs qui dégénèrent donc dans l'utérus. Ces effets phénotypiques, chez le mâle et la femelle, sont attribués à une différenciation anormale des neurones spécifiques au sexe.

De même, il a été montré que l'expression ectopique du gène *white* (*w*) sous le contrôle du promoteur de choc thermique *hsp70* induit un changement significatif du comportement sexuel des mâles dans le sens qu'ils se courtisent vigoureusement les uns les autres (Zhang et Odenwald, 1995 ; Hing et Carlson, 1996). Le comportement de cour mâle-mâle est maintenu même après amputation des antennes, des palpes maxillaires et des ailes, ce qui indique son origine centrale. Même en présence de femelles, la plupart des mâles réalisent ce comportement homosexuel en formant de longues chaînes ou des cercles. Par contre, le comportement sexuel des femelles ne paraît pas être affecté par l'expression ectopique du gène *white*. Du fait que ce gène code le transporteur du tryptophane, qui est utilisé comme précurseur de la sérotonine, Zhang et Odenwald ont pensé que l'expression ectopique de *white* pouvait diminuer les niveaux de sérotonine dans le système nerveux en diminuant les niveaux de tryptophane, et entraîner un comportement de cour mâle-mâle.

D'autres comportements de cour où comme chez les mâles *fruitless*, l'orientation sexuelle des drosophiles est altérée, ont été observés. Sharma (1977) a rapporté que les

mouches mâles portant une translocation réciproque entre le chromosome X (région 2E) et le chromosome III (région 97A) réalisent ce comportement de cour après exposition à la lumière. Ce comportement induit par la lumière dure aussi longtemps que les mouches y sont exposées. Ainsi, en présence de lumière, les mâles n'arrivent plus à discriminer les sexes.

Récemment, Kitamoto (2002) a montré que le comportement de cour mâle-mâle chez la drosophile pouvait être provoqué rapidement en perturbant, dans certaines conditions, la transmission synaptique. En effet, il est possible de contrôler de façon temporelle et spatiale l'activité de certains neurones *in vivo*, par un allèle sensible à la température de la protéine Shibire qui est une dynamine (GTPase synaptique) (Kitamoto, 2001). Par l'intermédiaire du système UAS_G-Gal4, il a été possible d'exprimer le gène *Shibire* (*Shi^{ts}*) dans des neurones centraux et périphériques grâce à la lignée enhancer-trap 309-Gal4 et Kitamoto a montré qu'en réalisant un changement rapide de température (30°C), les mâles adoptent, immédiatement après (deux minutes), un comportement de cour mâle-mâle en formant des chaînes entre eux. De façon plus précise, il a montré que ce serait la perturbation de neurones cholinergiques, à travers les neurones exprimant Gal4 dans cette lignée, qui serait responsable de l'induction de ce comportement mâle-mâle aberrant.

Dans ce chapitre, nous décrivons précisément le comportement de cour des mâles dépourvus des cellules à IFamide, comportement qui sera mis en relation avec celui des mâles mutants qui viennent d'être évoqués.

RESULTATS

Dans le chapitre deux, les études immunohistologiques ont permis de constater que l'ablation des cellules à IFamide est bien effectuée et que la perte des neurones n'est pas létale pour les mouches. En effet, aussi bien les mâles que les femelles présentent un aspect morphologique normal et sont viables. Étant donné que l'homologue de l'IFamide a été identifié pour sa stimulation des contractions de l'oviducte, l'hypothèse d'un rôle important de ce neuropeptide dans la reproduction se pose. Dans ce contexte, il nous a paru intéressant de tester la fertilité de ces mouches, à savoir si les mâles et les femelles sont capables d'obtenir une descendance viable.

1- La fertilité des mouches

1-1- Les mâles

Des mâles contrôles (CS), des mâles mutants *Fru* et des mâles sans cellules à IFamide (PHR) sont placés individuellement dans un grand tube avec 3 ou 4 femelles vierges et la présence de descendants est déterminée 10 jours plus tard. Comme le montrent les résultats (Tableau 9), tous les mâles testés ont eu une descendance et sont donc fertiles, sauf pour les mutants *fruitless* (contrôle négatif)

| <i>Génotypes</i> | <i>Fertile/Totale</i> |
|-------------------|-----------------------|
| <i>CS sauvage</i> | 9/10 |
| <i>PHR</i> | 32/32 |
| <i>Fru</i> | 0/4 |

Tableau 9 : Fertilité des mâles

1-2- Les femelles

Pour étudier la fertilité des femelles, une seule femelle vierge est placée dans un tube avec 3 ou 4 mâles sauvages pendant 1 h, après quoi elle est transférée dans un nouveau tube et la présence de descendants est observée 10 jours après (Tableau 10).

| <i>Génotypes</i> | <i>Fertile/Totale</i> |
|-------------------|-----------------------|
| <i>CS sauvage</i> | 42/46 |
| <i>PHR</i> | 47/48 |

Tableau 10 : Fertilité des femelles

Les résultats montrent sans ambiguïté que les femelles sans neurones à IFamide sont également fertiles.

Ensuite, nous avons croisé des mâles et femelles ne possédant plus les neurones à IFamide et évalué, lors de la génération suivante, la présence ou l'absence de descendance. De façon assez attendue, nous avons obtenu des descendants. De ce fait, il a été possible de générer des lignées stables d'individus sans neurones à IFamide. Ainsi, même si on ne peut conclure définitivement sur l'importance de ces cellules, on peut dire qu'elles ne sont pas essentielles pour le développement ou la reproduction.

2- Le comportement sexuel

Bien qu'initialement les drosophiles ne possédant plus les quatre neurones à IFamide nous soient au premier abord apparues physiquement normales, nous avons observé des anomalies dans le comportement des mâles entre eux : les mâles se suivent et se courtisent. Comme nous l'avons vu précédemment, le comportement sexuel des mâles est bien caractérisé chez la drosophile. Nous avons entrepris de l'étudier chez les drosophiles dépourvues de leurs quatre neurones à IFamide.

2-1- Observation de paires d'individus

Pour déterminer si les mâles mutants exhibent une préférence sexuelle suivant les partenaires proposés, nous avons proposé à ces mâles des cibles mâles ou femelles vierges sauvages. Leur comportement de cour a été quantifié en mesurant le paramètre d'appel sexuel (SAP) et l'index de cour (IC) qui sont respectivement le pourcentage de temps où le mâle réalise l'extension de l'aile (produisant le chant amoureux) et le pourcentage de temps où le mâle réalise les différentes étapes de cour.

2-1-1- Comportement des mâles envers les femelles

De façon attendue, tous les mâles testés courtisent les femelles. Quand un mâle sauvage courtise une femelle vierge sauvage, son index de cour est environ de 85 % et son SAP environ de 30%. Pour les mâles des différentes lignées testées, les valeurs sont très proches (IC de 75% et SAP de 20%) sauf pour les lignées PHR qui ont un IC et un SAP de 94% et 42% respectivement. Ainsi, à première vue, il n'y a pas de différence évidente entre le comportement de cour envers les femelles entre des mâles sauvages et ceux qui ne possèdent plus les neurones à IFamide (Figure 28).

Il est à noter que les mâles PIFA3, qui portent le transgène P{promIFa-Gal4} sur le chromosome 3, courtisent très mal les femelles avec un IC de 11%. Ces comportements peuvent être expliqués par la perturbation génétique créée soit par l'insertion du transgène soit par la présence du balancier TM3.

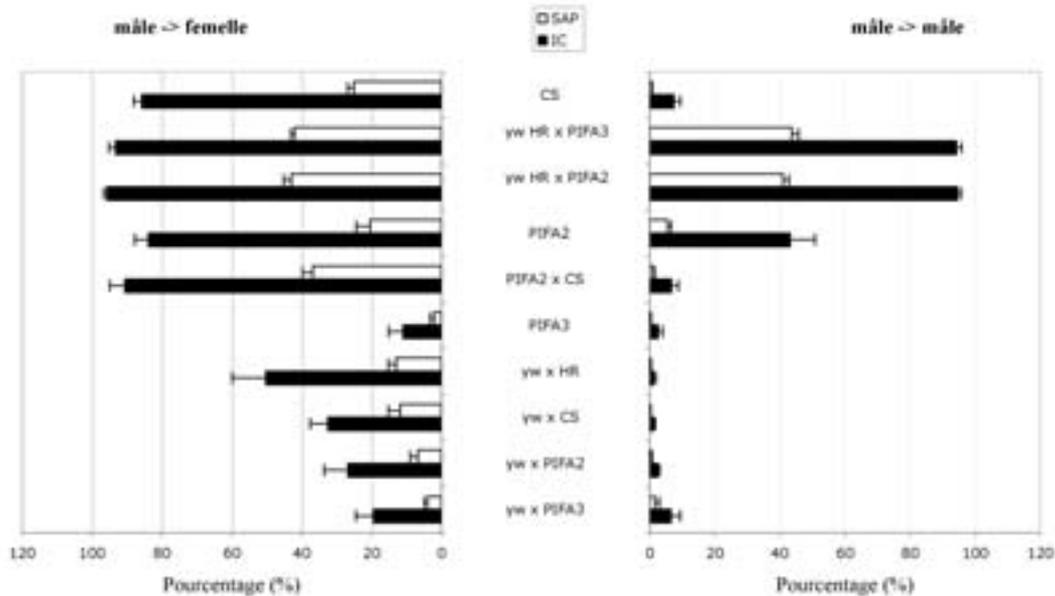


Figure 28 : Comportement de cour de différents mâles présentés soit à une femelle (à gauche), soit à un mâle sauvage (à droite). Les moyennes des valeurs d'IC et de SAP \pm SEM ($n \geq 10$) sont quantifiées respectivement pour les génotypes des mâles suivants : (1) CS (+/+), (2) yw HR x PIFA3 ($y,w,UAS-hid,UAS-rpr; prom-IFa3-GAL4/+$), (3) yw HR x PIFA2 ($y,w,UAS-hid,UAS-rpr; prom-IFa2-GAL4/+$), (4) PIFA2 ($w; prom-IFa2-GAL4$), (5) PIFA2 x CS ($w; prom-IFa2-GAL4/+$), (6) PIFA3 ($w;; prom-IFa3-GAL4/TM3SbSr$), (7) yw x HR ($y,w,UAS-hid,UAS-rpr$), (8) yw x CS ($y,w/+$), (9) yw x PIFA2 ($y,w; prom-IFa2-GAL4/+$), (10) yw x PIFA3 ($y,w;; prom-IFa3-GAL4/+$).

2-1-2- Comportement des mâles envers d'autres mâles

En condition normale, quand un mâle sauvage est présenté à un autre mâle sauvage, ils ne se courtisent pas mutuellement. Immédiatement après leur présentation, ils interagissent un peu, mais ce comportement s'arrête au bout de quelques secondes.

Cependant, quand les mâles ne possédant plus les neurones à IFamide sont présentés à des mâles sauvages, les résultats sont différents (Figure 28). Leurs valeurs de SAP et d'IC sont très élevées et sans ambiguïté significativement supérieures à celles des lignées parentales et sauvages. Les valeurs de SAP et d'IC sont respectivement de 42% et 94% et donc très proches de celles qui sont obtenues vis-à-vis des cibles femelles. Ainsi, les mâles

sans cellules à IFamide courtisent de façon nette et constante les mâles et ce, aussi intensément que s'ils courtaient des femelles.

Par contre, ce comportement de cour n'a jamais été observé chez des mâles sauvages ou des mâles des lignées parentales, c'est-à-dire ceux qui portent les éléments P du PromIFa-GAL4 et UAS-rpr ou ceux qui portent la combinaison UAS-hid/UAS-rpr.

2-2- Effets des gènes *yellow* et *mini-white*, sauvetage avec *p35*

Dans nos premières expériences de comportement de cour, pour obtenir des drosophiles sans neurones à IFamide, nous avons utilisé la lignée possédant les deux transgènes apoptotiques UAS-hid/UAS-rpr. Ces mouches portent la mutation pour le gène *yellow* (couleur jaune du corps) ainsi que la mutation du gène *white* (couleur blanche des yeux) et ces mutations sont connues pour affecter le comportement sexuel des mâles (Burnet et al., 1973, Sciandra et Bennett, 1976). En effet, les mouches mâles portant le gène *w* ont du mal à s'orienter et à suivre la femelle, ce qui peut résulter parfois en l'arrêt du comportement de cour. Les mâles portant le gène *yellow* ont des difficultés à réaliser le champ amoureux (avec un SAP diminué de plus de 50% par rapport à la souche sauvage), et nous observons que les femelles sauvages sont moins réceptives à de tels mâles et se laissent moins facilement monter. Les résultats confirment un effet négatif des gènes *w* et *y* sur le comportement sexuel car ces mâles présentent un index de cour de 33% seulement (Figure 29). Cependant, bien qu'ils portent le gène *yellow* et *white*, les mâles dépourvus de cellules à IFamide courtisent les femelles aussi intensément que les contrôles et même avec un index de cour supérieur à celui de la souche sauvage.

Les souches parentales possèdent un ou deux transgènes (P{PromIFa-GAL4} ou P{UAS-hid}-P{UAS-rpr} ou P{UAS-rpr} ou P{UAS-p35}) dans leur génome et les mouches dont les neurones à IFamide ont été éliminés en portent trois. Chaque transgène porte le gène *mini-white* qui compense la mutation *w* et entraîne la pigmentation des yeux. Les mouches qui possèdent plusieurs de ces éléments P dans leur génome ont donc les yeux colorés (yeux rouges) et une vue normale ce qui leur permet de courtiser parfaitement. Il est cependant connu que l'expression ectopique du gène *mini-white* induit un comportement bisexuel des mâles (Zhang et Odenwald 1995 ; An et al., 2000). Donc chez les mâles dépourvus de cellules à IFamide, la possibilité que la combinaison de plusieurs gènes *mini-white* puisse rendre les mâles bisexuels, n'a pu être ignorée. Ainsi, nous nous sommes demandés si c'est réellement l'ablation des cellules à IFamide seule qui est responsable de ce type de comportement.

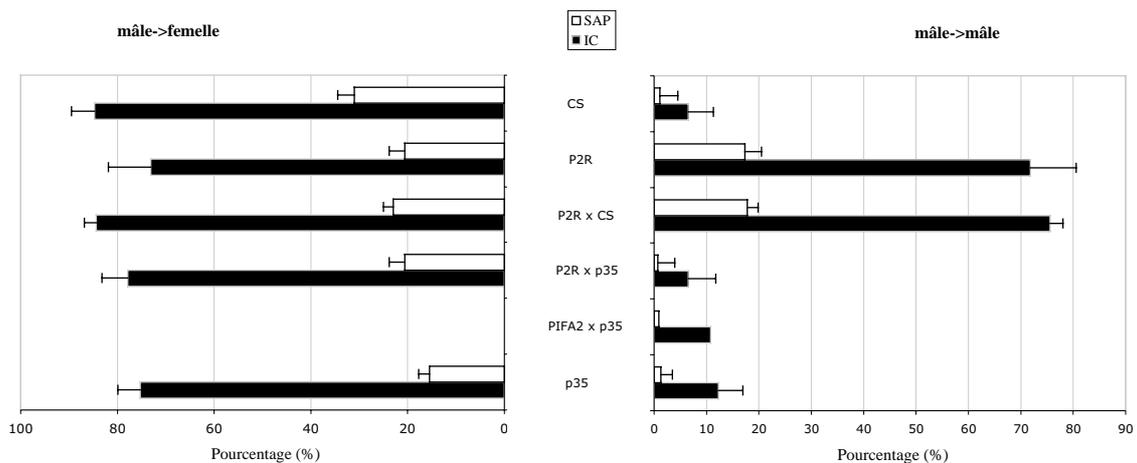


Figure 29 : Comportement de cour de différents mâles présentés soit à une femelle, soit à un mâle sauvage. Les moyennes des valeurs d'IC et de SAP \pm SEM ($n \geq 10$) sont quantifiées respectivement pour les génotypes des mâles suivants : (1) CS (+/+), (2) P2R (*w,UAS-rpr; promIFa2-GAL4*), (3) P2R x CS (*w,UAS-rpr; promIFa2-GAL4/+*), (4) P2R x p35 (*w,UAS-rpr; UAS-p35, promIFa-GAL4/+*), (5) PIFA2 x p35 (*w; UAS-p35, promIFa2-GAL4 /+*) non déterminé pour une cible femelle, (6) p35 (*w; UAS-p35*).

Les mâles possédant une seule copie de P{PromIFa-GAL4} et donc une copie de mini-*white* possèdent un index de cour envers les mâles d'environ 7% (Figure 29). Ils ne courtisent pas les mâles et montrent un comportement hétérosexuel normal. Par contre les mâles qui possèdent deux copies de P{PromIFa-GAL4} courtisent les autres mâles avec un index de cour d'environ 43%. Ces résultats confirment que lorsque P{PromIFa-GAL4} et donc le gène mini-*white* est à l'état homozygote, les mâles ont un comportement de cour non discriminant et que les mouches hétérozygotes pour P{PromIFa-GAL4} montrent un comportement de cour normal (et les mâles discriminent sans problème). Par contre le gène mini-*white* dans les constructions P{UAS} que nous avons utilisées, n'affecte pas le comportement de cour même à l'état homozygote comme les résultats le montrent pour les lignées homozygotes P{UAS-p35} ou hémizygotés P{UAS-hid}-P{UAS-rpr}.

Nous avons préalablement montré, par immunohistochimie, que l'expression de Reaper dans les neurones à IFamide tue ces cellules. L'utilisation de cette lignée offre deux avantages. Premièrement, cette lignée ne porte pas la mutation du gène *yellow* et deuxièmement, l'action apoptotique de la protéine Reaper peut être efficacement inhibée par l'expression simultanée de la protéine p35 dans ces mêmes cellules.

Les individus, dont les neurones à IFamide sont préservés, portent trois gènes mini-*white* : un gène mini-*white* de la construction P{PromIFa-GAL4} et deux gènes mini-*white*

des constructions P{UAS-rpr} et P{UAS-p35} respectivement. Quand ces mâles sont présentés à d'autres mâles, ils ne les courtisent pas, adoptant ainsi un comportement hétérosexuel normal. En effet, les mâles ont un index de cour de 6,5%, valeur qui n'est pas différente de celles des lignées contrôles. Donc le sauvetage des cellules à IFamide par p35 permet de rétablir le comportement de cour hétérosexuel.

Ainsi, les effets observés sur le comportement sexuel des mâles sans cellules à IFamide ne sont pas dus à l'expression ectopique et/ou à la présence d'un ou plusieurs gènes *mini-white* associés aux différents transgènes. Ils ne peuvent être expliqués que par l'absence des neurones à IFamide. Nous montrons donc que le phénotype de comportement bisexuel est étroitement lié à la disparition des cellules à IFamide.

2-3- Ménage à trois

Dans cette expérience, nous avons voulu déterminer si les mâles sans neurones à IFamide montrent une préférence sexuelle dans une circonstance de présentation simultanée de deux cibles, l'une mâle, l'autre femelle. Le comportement de cour des trios est quantifié et les résultats sont montrés dans la figure suivante (Figure 30).

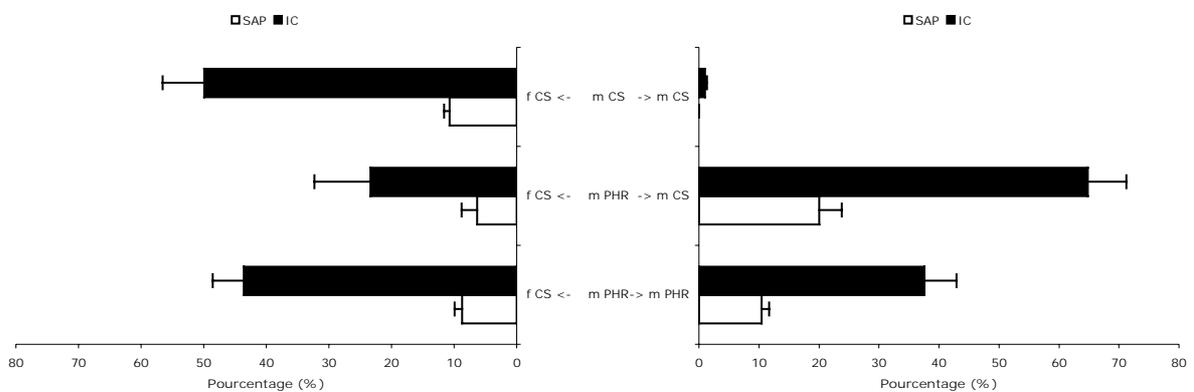


Figure 30 : Comportement de cour de mâles présentés simultanément à deux partenaires. Les moyennes des valeurs d'IC et de SAP \pm SEM sont quantifiées respectivement pour les différentes combinaisons : mâle CS + un mâle CS + une femelle CS (n=5), mâle PHR + un mâle CS + une femelle CS (n=5), mâle PHR + un mâle PHR + une femelle CS (n=14).

Nous avons étudié le comportement de mâles sauvages quand ils sont présentés simultanément à un mâle et à une femelle sauvages. Nous remarquons que le mâle ne courtise que la femelle bien que son index de cour ne soit que de 50% environ. En effet, le mâle cible,

présenté en même temps que la femelle, la courtoise également de façon soutenue et ainsi entre en compétition avec le mâle que l'on étudie.

Les résultats sont bien différents pour les mâles PHR. Nous constatons qu'ils courtisent aussi bien les deux cibles mais avec un index de cour plus important envers la cible mâle (IC de 63%) qu'envers la cible femelle (IC de 23%). On pourrait interpréter ce résultat comme une préférence des mâles sans neurones à IFamide à courtiser les mâles par rapport aux femelles mais il n'en est rien. En effet, étant donné que le mâle sauvage courtise également la femelle en se positionnant derrière elle, le mâle PHR ne montrant pas de préférence à courtiser la femelle ou le mâle, est supplanté par le mâle sauvage auprès de la femelle. Ainsi, le mâle PHR se trouvant derrière le mâle sauvage le courtise davantage tandis que ce dernier courtise la femelle.

Cette interprétation est confirmée lorsque nous présentons un mâle PHR à un autre mâle PHR et une femelle sauvage. Nous constatons que les deux cibles se font courtiser de la même façon avec un IC et un SAP très similaire confirmant que le mâle PHR ne montre aucune préférence de cour. En effet, ce dernier courtise alternativement la femelle et le mâle sans distinction aucune et se laisse également courtiser par le mâle PHR cible.

Ainsi, tous les mâles PHR courtisent leurs cibles sans discrimination aucune entre mâle et femelle.

2-4- Comportement de Chaining

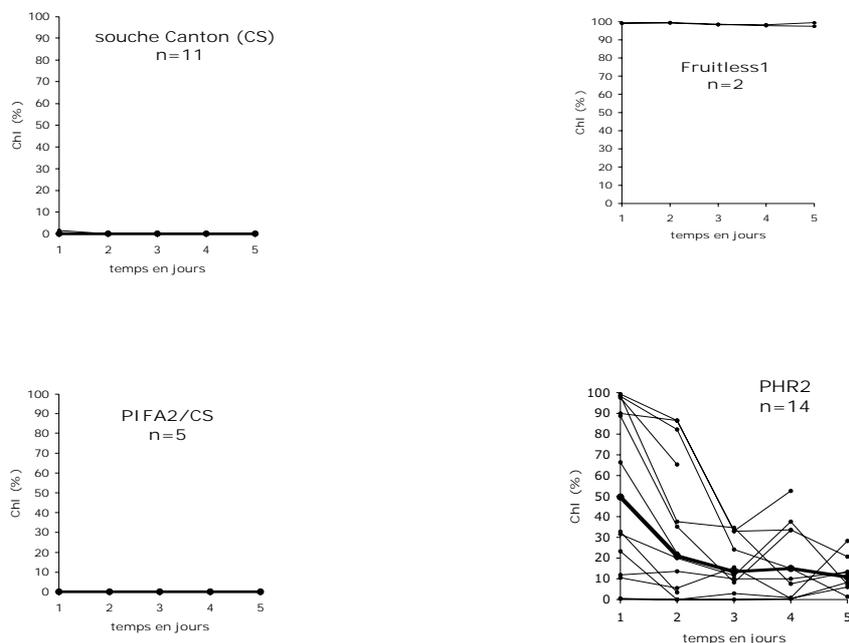
Nous avons observé que lorsque plusieurs mâles sans cellules à IFamide sont présentés les uns aux autres, ils se courtisent en groupe et s'engagent de façon typique dans le comportement de chaîne, appelé " chaining ", comportement intensivement caractérisé pour les mâles mutants *fruitless* capables de former de longues chaînes (Villella et al., 1997).

Ce comportement dépend également de l'âge des mouches et il est favorisé par le fait que les individus ne se " connaissent " pas. En effet, il a été constaté que les mâles mutants *fruitless* montrent peu de chaining quand ils ont été groupés préalablement à l'expérience. Nous avons voulu voir s'il en était de même chez les mâles sans cellules à IFamide. Ces mâles ont donc été groupés juste après leur éclosion puis ont été observés pour déterminer s'ils réalisent une éventuelle cour entre mâle, le jour même et les jours suivants. De façon attendue, ces mâles ne montrent que peu de comportement de chaîne voire aucun quand ils sont groupés dès le premier jour de leur naissance. Ce comportement de chaining est d'autant plus net que les mouches sont individualisées dans des tubes et vieillies pendant au moins 3

jours pour les mâles sans cellules à IFamide et 7 jours pour les mâles *fruitless*. C'est le protocole que nous avons utilisé lors de la réalisation des expériences de chaining.

Pour étudier les interactions de cour en groupe, l'index de chaining (ICh) a été mesuré. Les expériences ont été réalisées sur des individus de différents génotypes : la souche sauvage (contrôle négatif), les souches parentales, les descendants issus de différents croisements et les mutants *fruitless* (contrôle positif). Les IChs sont mesurés tous les jours et pendant plusieurs jours consécutifs (du jour 1 jusqu'au jour 5) ce qui permet de suivre le comportement des mâles par rapport aux premiers jours (Figure 31)

Les groupes de mâles sans neurones à IFamide (P2HR, P3HR, P2R et P3R) réalisent nettement le comportement de chaining. Ils se suivent les uns les autres en formant de longues chaînes, des cercles, des mêlées et d'autres figures géométriques. Nous avons noté que ce comportement est observé aussi bien sur la surface de la nourriture que sur la coupelle de chaining. Nous avons trouvé des différences significatives (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) en comparaison avec les souches parentales, la souche sauvage et le contrôle positif, et ceci pendant toute la période d'expérimentation comme le montre la figure ci-dessous.



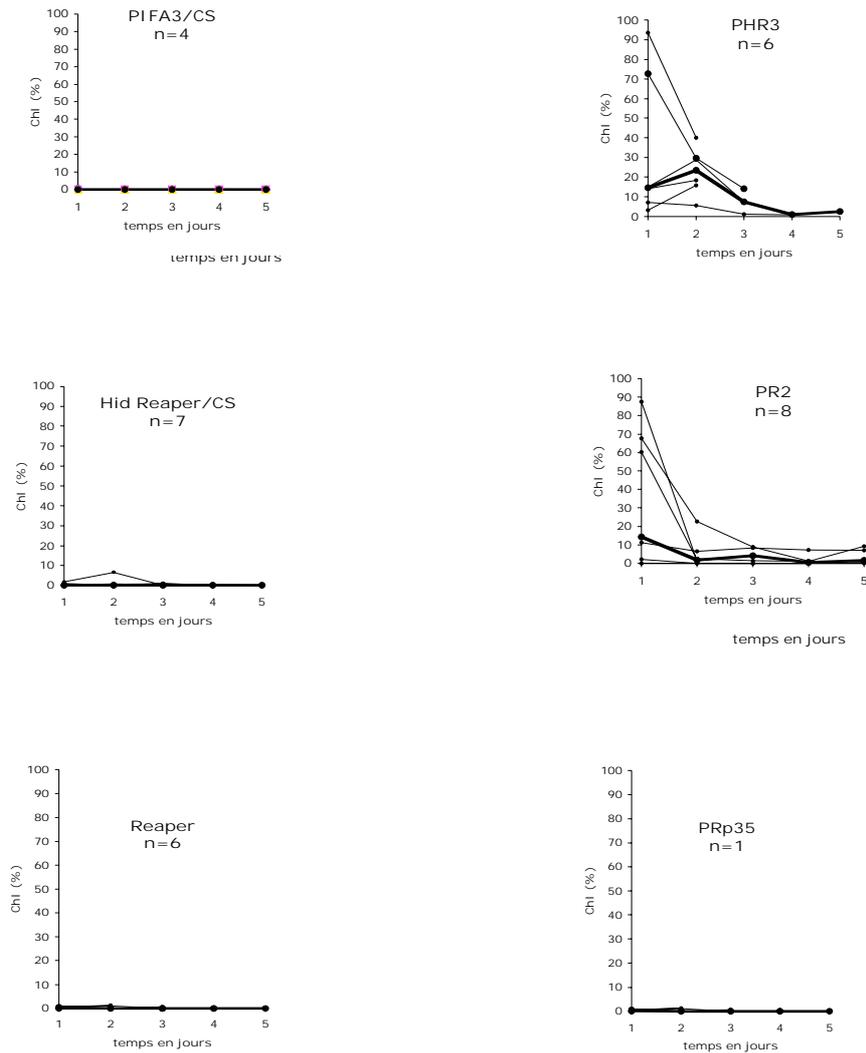


Figure 31 : Comportement de cour entre plusieurs mâles. Les moyennes des IChs \pm SEM, exprimées en pourcentage du temps où au moins trois mâles se font la cour, ont été quantifiées pour chaque groupe constitué de 8 mâles pendant 5 jours consécutifs. L'ICh n'est pas compté pour des coupelles où l'on observe la présence d'un (ou plusieurs) individu(s) mort(s).

Cependant, le comportement de chaining est très variable pour les lignées sans neurones à IFamide et tend à diminuer à partir du deuxième jour. En revanche la souche sauvage ainsi que les différentes souches parentales ne présentent pas d'activité de cour entre mâles. Le comportement de chaining des mâles mutants *fruitless* est très élevé (ICh de 99%) et continue pendant toute l'expérience ce qui les différencie des mâles sans cellules à IFamide. Chez ces derniers en effet, la formation de chaînes au premier jour de la réunion présente une très grande similitude avec celle que l'on observe chez les mâles *fruitless* mais

les jours suivants, les IChs sont bien moins importants et présentent une variabilité très importante. Il est à noter que l'ICh n'est jamais nul car on observe une continuité de ce comportement. Mais il se caractérise alors plus par une interaction de quelques mâles (au moins trois mâles en train de se courtiser) que par les longues chaînes observées le premier jour.

Les mâles mutants *fruitless* sont des individus dont le comportement présente des caractéristiques des deux sexes ; ils courtisent comme des mâles et se laissent courtiser comme des femelles. L'ambisexualité de ces mutants favorise le comportement de chaining et explique pourquoi les IChs sont aussi élevés et perdurent dans le temps. Ainsi, on obtient surtout des chaînes de formes circulaires ou linéaires, et ces chaînes persistent longtemps sans être interrompues.

En revanche, si les mâles PHR s'engagent au premier jour dans ce type de comportement, leurs IChs diminuent significativement les jours suivants. Cette diminution paraît être due au fait qu'ils ne se laissent plus facilement courtiser. On peut donc dire que plutôt que d'adopter des traits de comportement femelle, ils se comportent comme des mâles et rejettent la plupart du temps les avances des autres mâles. Ils manifestent en effet leurs refus en réalisant fréquemment le mouvement de cisaillement des ailes typique du comportement de rejet du partenaire. Cependant, ils continuent toujours à courtiser car comme nous l'avons vu précédemment, ils ne semblent toujours pas faire la différence entre mâle et femelle. Les formes de chaining obtenues sont surtout des figures en V car lorsqu'un mâle courtise un mâle, un troisième mâle interagit et essaye de le remplacer ce qui peut parfois dégénérer en mêlée ; on constate le même comportement lorsqu'on place deux mâles avec une femelle sauvage.

La diminution de l'index de chaining observée, au bout de 2 ou 3 jours, peut être en partie expliquée par une augmentation de l'agressivité des mâles. En effet, une agressivité intense de certains mâles sans neurones à IFamide a été observée dans les chambres d'accouplement. Ce comportement n'étant jamais observé dans les coupelles contenant les souches parentales et contrôles, on peut dire qu'il n'est dû ni à l'un des transgènes insérés dans leur génome ni à un quelconque facteur environnemental, mais bien à l'absence des neurones à IFamide. Notre hypothèse est qu'au bout de deux ou trois jours, le fait de cohabiter avec les mêmes individus du même sexe et de ne pas parvenir à copuler puissent les rendre agressifs, ce qui n'est pas le cas chez les individus contrôles ou parents. Il est intéressant de noter que les mutants *fruitless* (*fru*) et *disatisfaction* (*dsf*) ont été décrits comme plus agressifs que les contrôles sauvage (Lee et Hall, 2000).

3- Influence des gènes impliqués dans la voie de détermination sexuelle

En introduction, nous avons souligné que ce comportement bisexuel est également observé chez les mutants *fruitless* et *dissatisfaction* et par des mouches chez lesquelles le facteur de transcription *transformer* est exprimé ectopiquement dans certaines structures du cerveau comme les corps pédonculés et les lobes antennaires.

Bien que ces facteurs de transcription soient exprimés dans un nombre restreint de neurones du système nerveux de la drosophile, les neurones affectés sont bien plus abondants que les neurones à IFamide qui, rappelons-le, ne sont que quatre. Nous avons cherché s'il existait, néanmoins, une éventuelle présence de ces facteurs de transcription dans les cellules à IFamide.

Ainsi, grâce aux lignées de drosophiles possédant le promoteur de ces facteurs de transcription en amont de Gal4, nous avons croisé ces lignées homozygotes avec une lignée homozygote possédant le gène codant la protéine fluorescente GFP. La descendance de ce croisement a été analysée en réalisant un immunomarquage avec l'anticorps dirigé contre l'IFamide sur les cerveaux de larves et nous avons confirmé, après observation au microscope, qu'il n'y a pas de co-expression de l'IFamide avec les protéines Fruitless (Figure 21) et Dissatisfaction. Un autre argument contre le contrôle de l'IFamide par ces facteurs de transcription est l'absence de sites de liaison de ces facteurs dans le promoteur potentiel du gène de l'IFamide, comme nous l'avons décrit au chapitre deux.

Le facteur génétique *transformer* (*tra*) est connu pour contrôler le dimorphisme sexuel du fait qu'il influence la détermination sexuelle somatique. Le gène *tra* affecte également en amont les gènes de détermination sexuelle comme *fruitless* et *doublesex* qui contrôlent à leur tour les phéromones et l'orientation sexuelles. Nous avons donc fait exprimer la forme femelle du gène *tra* par les cellules à IFamide et étudié les conséquences de cette manipulation sur l'orientation sexuelle du mâle. Nous n'avons pas trouvé de changement au niveau de l'orientation de ces mâles dont les quatre neurones à IFamide ont été féminisés (IC \pm SEM ; $7,4 \pm 1,7$ (n=20) pour CS ; $24,7 \pm 7,7$ (n=13) pour w ; UAS-*tra* ; $29 \pm 6,1$ (n=20) pour w ; UAS-*tra* ; promIFa-Gal4).

Ainsi, il n'est pas évident d'établir une relation directe entre le comportement bisexuel de nos mouches sans IFamide et les mutants de facteurs de transcription impliqués dans les processus de détermination sexuelle.

4- Différences qualitatives du comportement de cour

Le comportement sexuel d'un mâle comprend différentes étapes qu'il entreprend de façon successive et qu'il est facile de visualiser par l'enregistrement vidéo. Tout d'abord, il s'oriente vis-à-vis de sa partenaire et si celle-ci se déplace, il la poursuit activement. Ensuite il initie le comportement de cour par le tapotement de l'abdomen de la femelle avec ses pattes avant. Ensuite, ces mâles essaient de lécher les parties génitales de la femelle en réalisant un contact de ces parties avec le proboscis. Régulièrement et pendant tout le temps de la parade amoureuse, les mâles réalisent de longues et fréquentes extensions de l'aile. Enfin, ils courbent leur abdomen et réalisent de multiples tentatives de copulation jusqu'à y parvenir.

Comme le font tous les mâles sauvages, les mâles sans neurones à IFamide réalisent toutes ces étapes de cour. Néanmoins, bien que l'index de cour et le paramètre d'appel sexuel soient normaux quand les mâles sans neurones à IFamide courtisent les femelles vierges, ces données quantitatives ne reflètent pas des différences qualitatives dans leur comportement.

En effet, nous avons observé que les mâles dépourvus de neurones à IFamide ne s'orientent pas aussi aisément qu'un mâle normal par rapport à une femelle. Ainsi quand un mâle normal se positionne derrière une femelle, il forme un angle approximatif de 30° alors qu'un mâle sans IFamide fait généralement des cercles autour de la femelle et réalise un nombre élevé d'interactions tête contre tête. Ces mâles paraissent très excités et souvent enchainent rapidement les différentes séquences de comportement de cour pour essayer de copuler. Dans certains cas, la femelle s'écarte du mâle. Si c'est un mâle sauvage, il la poursuit très vite alors que le mâle sans IFamide paraît ne pas s'apercevoir qu'elle s'est déplacée et arrête donc, au moins momentanément, de la courtiser. Ainsi, le comportement de cour des mâles sans IFamide est parfois saccadé, avec alternance de phases de cour active et de pauses. Cependant, étant donné que les mâles sont très excités, ils se remettent vite à courtiser la femelle jusqu'à ce qu'ils arrivent à copuler et c'est probablement pour cette raison que nous n'observons pas de différences quantitatives au niveau de l'index de cour. De façon encore plus bizarre, ces mâles réalisent parfois le chant amoureux dans un coin isolé de la chambre d'accouplement alors que normalement le mâle chante tout près et en direction de la femelle. Un tel comportement n'est jamais observé chez les individus de souche sauvage ou des souches parentales.

5- L'activité locomotrice

Lors de nos différentes expériences à propos du comportement de cour, nous avons très souvent remarqué que les mâles et les femelles sans cellules à IFamide paraissent plus actifs que les mouches sauvages. Il paraît possible que les neurones à IFamide interviennent aussi dans le comportement locomoteur, ce qui nous a poussés à tester l'activité locomotrice générale des mouches sans cellules à IFamide.

Nous avons quantifié, tout d'abord, l'activité locomotrice individuelle de mâles et femelles de différents génotypes pour déterminer l'influence éventuelle de l'élimination des neurones à IFamide sur leur comportement locomoteur. L'activité des mouches, automatiquement enregistrée durant le jour et la nuit, est quantifiée par le nombre moyen de passages de la mouche devant le faisceau détecteur pour chaque intervalle de cinq minutes. Les moniteurs sont placés dans des incubateurs à 25°C avec une photopériode de 12 h de lumière (8-20h) et 12 h d'obscurité, donc dans les conditions environnementales utilisées pour les expériences de comportement de cour. Les mesures sont réalisées pendant six jours consécutifs.

5-1- Activité locomotrice individuelle des mâles

Les activités locomotrices de mâles sauvages, des différentes lignées parentales (PIFA2, PIFA3, yHR et HR) ou des lignées dont les mâles sont dépourvus de neurones à IFamide (P2HR, yP2HR et P3HR), ont été mesurées. Les résultats sont présentés dans le graphe ci-dessous (Figure 32).

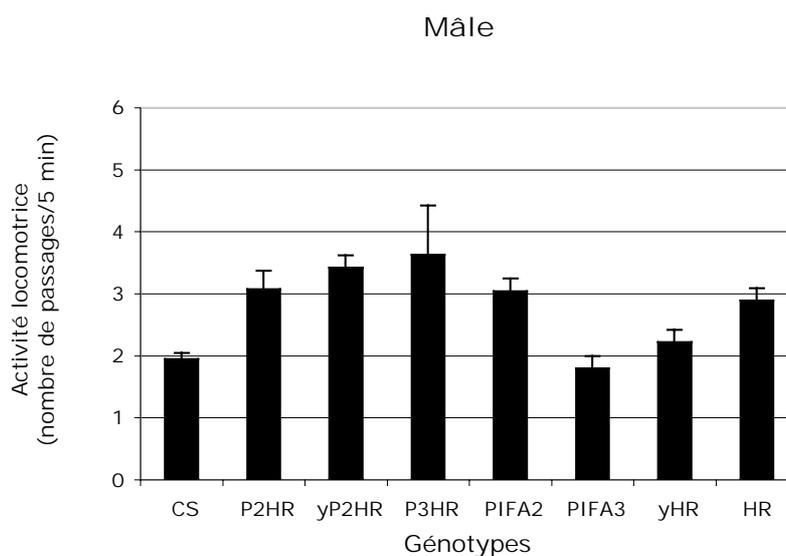


Figure 32 : Activité locomotrice individuelle de mâles de différents génotypes. CS (n=78), P2HR (n=35), yP2HR (n=64), P3HR (n=5), PIFA2 (n=71), PIFA3 (n=32), yHR (n=32), HR (n=31).

Les résultats confirment nos observations initiales, à savoir que les mâles sans neurones à IFamide possèdent une activité locomotrice plus importante que les mouches sauvages. Néanmoins, nous n'observons pas de différence significative avec les souches parentales (ANOVA, $p < 0,05$). En effet, les individus de la lignée PIFA2 et HR ont des niveaux d'activité locomotrice importants qui ne sont pas statistiquement différents de ceux des mâles issus du croisement de ces deux lignées. Nous constatons que l'insertion des transgènes P{PromIFa-GAL4} et P{UAS-hid}/P{UAS-rpr} dans le génome des drosophiles n'est pas sans effet sur le comportement locomoteur des mâles. L'élimination des neurones à IFamide ne perturbe donc pas significativement l'activité locomotrice des mâles.

5-2- Activité locomotrice individuelle des femelles

De la même façon que l'expérience précédente, les activités locomotrices de femelles sauvages, des différentes lignées parentales (PIFA2, PIFA3, yHR et HR) ou des lignées dont les individus n'ont plus les neurones à IFamide (P2HR, yP2HR et P3HR) ont été mesurées. Les résultats sont différents de ceux qui sont observés pour les mâles (Figure 33).

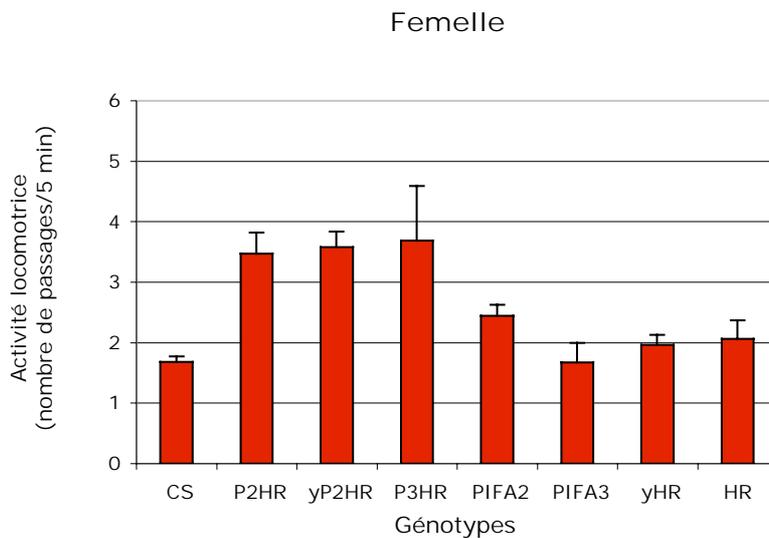


Figure 33 : Activité locomotrice individuelle de femelles de différents génotypes. CS ($n=58$), P2HR ($n=20$), yP2HR ($n=32$), P3HR ($n=8$), PIFA2 ($n=57$), PIFA3 ($n=16$), yHR ($n=32$), HR ($n=27$).

En effet, nous constatons une augmentation très significative (presque de 100%) de la locomotion chez les femelles dépourvues de neurones à IFamide par rapport à la souche sauvage. Cependant, étant donné que l'activité locomotrice des parents et celle de la souche

sauvage ne sont pas à des niveaux similaires, nous devons rester prudents quant à l'interprétation de ces résultats. L'élimination des neurones à IFamide paraît augmenter l'activité locomotrice des femelles, mais nous ne pouvons exclure l'implication du fond génétique des différentes lignées parentales dans les mesures de locomotion observées chez les femelles sans cellules à IFamide.

DISCUSSION

Les mâles dépourvus de neurones à IFamide paraissent normaux ; ils courtisent les femelles de façon efficace et sont fertiles quand ils copulent. Leur défaut est qu'ils n'ont pas de préférence sexuelle et qu'ils réalisent une cour vigoureuse aux individus des deux sexes. Les expériences de "ménage à trois" montrent clairement que c'est la discrimination sexuelle des mâles sans neurones à IFamide qui est perturbée car ces mouches courtisent activement et indifféremment des cibles mâles et/ou femelles. Ils sont ainsi bisexuels, en ce sens qu'ils courtisent aussi bien des mâles que des femelles, mais sans se laisser courtiser par un autre mâle. Dans l'introduction, nous avons souligné que le comportement sexuel des mâles est variable et dépend de différents facteurs environnementaux et génétiques. La question qui se pose est : les effets observés peuvent-ils être dus à un facteur autre que l'absence des cellules à IFamide *per se* ? Autrement dit : l'absence des cellules à IFamide est-elle responsable de ce comportement bisexuel ?

Tout d'abord, le lieu d'insertion de l'élément P{promIFa-gal4} dans le génome pourrait être responsable du comportement bisexuel. Cependant, nous avons obtenu trois lignées de transformants, avec le transgène P{promIFa-gal4} inséré à différents endroits du génome, et quand nous les croisons avec les lignées possédant un élément P qui porte la séquence codant une protéine apoptotique sous contrôle de Gal4, nous obtenons le même phénotype. Nous pouvons donc affirmer que ce comportement de bisexualité n'est pas dû à un effet de position de l'élément P dans le génome.

Par ailleurs, le comportement de cour entre mâles est observé quand le gène *mini-white* est exprimé de façon ectopique, par exemple lorsque le gène *mini-white* est sous le contrôle du promoteur de la protéine de choc thermique Hsp-70 et que les mouches subissent un choc thermique à 37°C (Zhang et Odenwald, 1995 ; Hing et Carlson, 1996). Donc, la présence de plusieurs copies de *mini-white* dans le génome pourrait elle aussi *a priori* donner lieu à une expression ectopique de *mini-white* (sans choc thermique) suffisamment importante pour expliquer le comportement bisexuel de nos mouches. Les mouches sans cellules à IFamide créées par la combinaison des éléments P{promIFa-gal4}, P{UAS-hid} et P{UAS-rpr} ont trois copies de *mini-white*. Cependant, les mâles dont les neurones à IFamide ont été éliminés par la seule combinaison de P{promIFa-gal4} et P{UAS-rpr} n'ont que deux copies

de mini-*white* et sont bien bisexuels. De plus, lorsque ces deux copies du mini-*white* sont présentes avec une troisième copie apportée par le transgène UAS-p35, induisant la survie des cellules à IFamide, ces mâles ne sont pas bisexuels. Ce dernier point démontre que le comportement bisexuel observé n'est pas dû à l'action du gène mini-*white* mais uniquement à l'absence des neurones exprimant le neuropeptide IFamide.

Il est intéressant de souligner l'effet apparent du gène *yellow* sur nos mouches sans IFamide. Cette mutation induit normalement une diminution notable du comportement de cour chez les mâles qui le portent. Néanmoins, chez les mâles qui ne possèdent plus les cellules à IFamide la mutation *yellow* ne paraît pas diminuer ce comportement. Cette observation est intéressante, car elle pourrait indiquer que, chez ces mâles, l'absence de cellules à IFamide se traduirait surtout par une augmentation de l'activité sexuelle.

Nous avons montré que l'ablation de quatre neurones dans le cerveau de la drosophile perturbe l'orientation sexuelle des mâles. Nos études d'immunohistologie et d'hybridation *in situ* n'ont révélé que quatre neurones de la *pars intercerebralis* capables de produire le neuropeptide IFamide. De plus, lorsque nous utilisons la séquence du promoteur du gène de l'IFamide en amont de Gal4 pour diriger l'expression de la protéine GFP, nous trouvons à nouveau que seules ces quatre mêmes cellules expriment la protéine fluorescente. Cela suggère clairement qu'il n'y a pas d'autres cellules à IFamide et que ce sont les seuls neurones dans l'insecte entier qui produisent ce neuropeptide. Le fait que ces quatre cellules sont les seules à produire ce neuropeptide indique qu'il est très probable que l'IFamide soit le neurotransmetteur/neuromodulateur principal de ces cellules et que l'IFamide est responsable des effets observés. Il est donc tentant de penser que les mêmes effets auraient pu être obtenus chez des mouches ayant une mutation nulle pour le gène de l'IFamide. Malgré nos tentatives, nous ne sommes pas parvenu à obtenir un tel mutant, et en conséquence la question de savoir si oui ou non l'IFamide est le neurotransmetteur directement responsable des effets observés reste posée.

Il semble que l'élimination des cellules à IFamide lève une inhibition : celle de courtiser des mâles. Les neurones à IFamide feraient donc partie du réseau de neurones qui permet le déclenchement d'un comportement de cour et interviennent en exerçant une inhibition sur un « centre » assurant ce déclenchement. Cette hypothèse est confortée par une observation qui concerne le gène *yellow*, gène dont la mutation diminue fortement le

comportement de cour (Burnet et al., 1973). Chez les mouches sans IFamide, la mutation de ce gène n'a pas cet effet, comme si l'inhibition exercée par *yellow* sur l'activité sexuelle était compensée par l'absence des cellules à IFamide. Nous savons que la parade amoureuse de la drosophile est un comportement nécessitant toute une gamme de perceptions sensorielles et que chacune des différentes phases de ce comportement est plus particulièrement liée à un type de perception sensorielle (visuelle, auditive, gustative, tactile) (Jallon, 1984, Greenspan et Ferveur, 1998). On peut proposer un schéma dans lequel, chez la mouche normale, la concordance de plusieurs signaux sensoriels est requise pour déclencher le comportement de cour. En l'absence des cellules à IFamide, c'est-à-dire lorsque ces signaux ne sont plus inhibés/modifiés par l'IFamide, un seul signal sensoriel peut être suffisant pour déclencher le comportement de cour. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi nos mouches adoptent parfois une parade amoureuse vers des cibles non appropriées, comme des mouches mortes, des pupes, et même des exuvies de pupes (et d'autres cibles). Bien que le comportement de cour vers ces cibles ne soit pas aussi rapide et soutenu, les mâles sans IFamide le déclenchent tout de même, en réalisant toutes les différentes étapes de cour incluant les tentatives de copulation (observations préliminaires).

Dans le cas où notre hypothèse serait correcte, à savoir que nos mouches sont sexuellement hyperactives, on pourrait considérer l'hyperactivité comme la cause de la bisexualité apparente. Les mouches sans IFamide ne seraient pas vraiment bisexuelles, comme le sont les mâles *fruitless*. En effet, dans cette souche, les mâles s'engagent spectaculairement dans le comportement de chaining caractérisé par la formation de longues chaînes de mâles qui se font la cour les uns les autres (Villella et al., 1997). Au départ, nos mâles sans IFamide présentent un comportement similaire, mais au bout de quelques jours, ils ne se laissent plus si facilement courtiser et deviennent même agressifs. Une autre différence entre les mâles *fruitless* et nos mâles sans IFamide est le fait que ces derniers ne paraissent pas attrayants pour un mâle normal, car dans nos expériences nous avons rarement vu un mâle normal faire la cour à un mâle sans IFamide. Les mâles *fruitless*, au contraire, sont activement courtisés par les mâles sauvages (Gailey et Hall, 1989). L'hypothèse d'une hyperactivité sexuelle chez les mâles sans IFamide pourrait aussi expliquer certains problèmes d'orientation que nous avons observés de temps en temps, et aussi le fait que ces mâles essayent de copuler avec leur partenaire de façon rapide et maladroite. De plus, nous avons observé que le mâle réalise parfois le chant amoureux tout seul sans que la femelle soit proche de lui, ce qui peut également s'expliquer par un état d'excitation important. L'observation de l'augmentation de

l'activité locomotrice chez les femelles renforce également cette idée et s'expliquerait par la recherche d'un partenaire sexuel. Dans ce sens, il serait intéressant de tester si cette hypothèse est valable pour les femelles en analysant par exemple leur réceptivité sexuelle.

Néanmoins, bien que cette hypothèse soit attractive, elle n'est pas nécessairement correcte. Nous n'avons pas d'arguments définitifs pour exclure la possibilité selon laquelle l'absence de l'IFamide empêche le système nerveux d'intégrer correctement l'information sensorielle. Cette mauvaise intégration de l'information sensorielle pourrait être la cause directe de la perte de discrimination des partenaires sexuels. Cette deux hypothèses, qui ne s'excluent pas obligatoirement l'une l'autre, pourraient justifier l'abondance de l'IFamide dans de nombreuses structures neuropilaires sensorielles. Nous sommes conscients que d'autres hypothèses peuvent être formulées, mais avec les données disponibles celles qui sont avancées paraissent les plus plausibles.

Indépendamment du mécanisme à travers lequel l'IFamide pourrait agir, il se pose également la question de savoir si l'IFamide agit surtout (et peut être exclusivement) sur le comportement ou influence également la physiologie générale. De la même façon, l'on peut se demander si l'action de l'IFamide est spécifique aux processus reproductifs, ou si l'IFamide a un champ d'action plus large. Ces questions sont très intéressantes et ouvertes à l'expérimentation, mais pour le moment nous n'avons pu tenter d'y répondre.

La plupart des mutants exhibant des comportements de cour mâle-mâle aberrant chez la drosophile ont leur système nerveux modifié irréversiblement par la perturbation génétique des programmes de développement (Yamamoto et al., 1998). Cela est notamment le cas pour les mutants *fruitless* et *dissatisfaction* et également lorsque le facteur de transcription *transformer* est exprimé ectopiquement dans certaines structures du cerveau (Ferveur et al., 1995 ; O'Dell et al., 1995). Cependant, nous avons montré que l'IFamide n'est pas détectable dans les cellules qui expriment les facteurs de transcription *fruitless* et *dissatisfaction* et que l'expression de la forme femelle de *transformer* dans les cellules à IFamide ne change pas le comportement de cour des mâles. Ainsi, nous pouvons écarter l'implication directe de ces facteurs de transcription dans l'observation du comportement bisexuel des mouches sans IFamide.

Récemment, Kitamoto (2002) a pu induire le comportement de cour mâle-mâle de façon transitoire, en augmentant la température. Il a utilisé une lignée enhancer trap (lignée

C309) qui exprime Gal4 dans des ensembles de neurones plus ou moins bien définis (*pars intercerebralis*, corps pédonculés et ganglion sous-œsophagien entre autres) pour faire exprimer un allèle sensible à la température de la protéine Shibire qui bloque la transmission synaptique. Lorsque les mâles sont placés à la température qui inactive shibire dans les cellules où Gal4 est exprimé, les mâles courtisent instantanément les mâles en réalisant le comportement de chaining (avec un niveau d'interaction tête-tête élevé).

D'une façon similaire, nous avons utilisé cette approche qui est plus subtile et moins brutale que l'élimination des cellules. En effet, cette méthode évite l'inactivation des neurones au cours du développement et également permet de rendre réversibles les effets et donc de tester l'implication des neurones et des neuropeptides qui y sont produits. Cependant, étant donné que les neuropeptides sont empaquetés dans des vésicules à cœur dense qui sont produites par l'appareil de Golgi, l'inhibition par shibire du recyclage des vésicules synaptiques n'empêche pas la libération de l'IFamide. En effet, nos expériences confirment l'absence d'effet de l'expression de shibire dans les cellules à IFamide (résultats non montrés).

Les mâles C309/UAS-shi^{ts1}, placés à une température de 30 °C, n'ont pas seulement perdu leur préférence sexuelle, mais ont également une activité de cour diminuée envers les femelles et du mal à copuler. Bien que les mâles sans IFamide paraissent sexuellement un peu moins habiles parfois, ils courtisent cependant bien les femelles et copulent sans problème. Cette différence entre ces deux types de mâles bisexuels n'indique pas nécessairement une différence dans les processus qui déterminent la préférence sexuelle. Il est donc tout à fait possible que les cellules à IFamide et celles qui sont impliquées dans la régulation de la préférence sexuelle forment un même réseau neuronal.

En conclusion, nous avons montré chez la Drosophile, que l'ablation génétique spécifique d'un noyau cérébral constitué de quatre neurones peptidergiques pourrait être corrélée à l'induction d'un comportement bisexuel du mâle. Cette relation entre un neuropeptide et un comportement sexuel a déjà été rapportée dans l'espèce humaine. En effet, Swaab et al. en 1990 ont montré que chez l'homme homosexuel, le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus contient deux fois plus de neurones à vasopressine que celui de l'hétérosexuel. Il n'est bien sûr pas question de mettre en parallèle un comportement humain dont les causes sont vraisemblablement multiples et le comportement de reproduction d'un insecte. Cependant, on peut considérer que le modèle du neuropeptide IFamide chez la drosophile, par sa relative simplicité, pourrait servir de base à l'étude de l'intervention d'un système neuropeptidergique dans l'élaboration d'un comportement donné.

CHAPITRE IV

CONSTRUCTION ET EXPRESSION D'UN GENE ARTIFICIEL DE NEUROPEPTIDE

INTRODUCTION

L'ambition de ce travail a été d'obtenir, pour la première fois, l'expression d'un précurseur de neuropeptide complètement artificiel. Comme chacune des étapes de la biosynthèse des neuropeptides a été analysée biochimiquement et que les mécanismes de bases sont connus (Taghert et Veenstra, 2003), nous avons tenté de construire un gène artificiel de neuropeptides (GAN) qui soit non seulement exprimé mais également transformé en un peptide mature et donc fonctionnel. Nous décrivons dans ce chapitre, la réalisation de la construction d'un tel gène artificiel codant un précurseur contenant plusieurs copies de deux neuropeptides différents. Nous avons choisi arbitrairement l'un des deux neuropeptides que notre équipe a identifiés, en l'occurrence l'IFamide, et un deuxième neuropeptide, l'endomorphine-1 de vertébrés qui est un peptide de quatre acides aminés (Zadina et al., 1997). Ce dernier choix a été basé sur le fait que nous voulions un neuropeptide amidé et que nous disposions d'un anticorps contre l'endomorphine-1, grâce à un don d'un de nos collègues, le Professeur G. Tramu. Cet anticorps permettra ainsi une analyse facilitée de l'expression de ce neuropeptide marqueur.

Plutôt que d'utiliser un précurseur naturel de neuropeptides, nous avons voulu utiliser un précurseur artificiel parce que ces derniers peuvent contenir plusieurs copies d'un même peptide alors que dans la majorité des cas, les précurseurs naturels n'en possèdent qu'une seule copie. De plus, le choix d'un précurseur artificiel permet d'éviter la présence de séquences du précurseur naturel qui pourraient avoir d'autres fonctions inconnues. Ainsi, les effets observés après l'expression dirigée d'un précurseur artificiel de neuropeptide peuvent être attribués uniquement au neuropeptide en question.

Les précurseurs de la plupart des neuropeptides subissent différentes modifications avant que les peptides matures ne soient obtenus (Figure 34). En effet, les neuropeptides sont issus de longs précurseurs polypeptidiques via une série de réactions enzymatiques réalisées séquentiellement. Après la transcription du gène codant le précurseur de neuropeptides, l'ARN messager produit est traduit en polypeptide dans le reticulum endoplasmique granuleux de la cellule pour former le prépropeptide. La traduction de l'ARNm commence à partir du premier AUG, mais bien que cette séquence soit suffisante pour permettre la traduction, l'efficacité de celle-ci est fortement influencée par les six nucléotides qui précèdent le codon d'initiation AUG et le nucléotide qui le suit. Ces nucléotides forment la

séquence consensus du site d'initiation de la traduction qui, chez les eucaryotes, est appelée site de Kozak (Kozak, 1987).

Étant donné que le neuropeptide doit être sécrété plus tard par la cellule par des vésicules de sécrétions produites de façon contrôlée, le précurseur doit entrer dans le réticulum endoplasmique et passer à travers l'appareil de Golgi dans une vésicule de sécrétion, tout en subissant différentes modifications. L'entrée du propeptide dans le réticulum endoplasmique est possible grâce à la présence d'un peptide signal qui correspond à la séquence hydrophobe N-terminale du précurseur. Ce peptide signal est éliminé lors de son entrée dans le réticulum par une signal peptidase qui coupe le peptide signal du précurseur à l'intérieur de la lumière du réticulum endoplasmique pour donner le propeptide. Cette séquence qui est reconnue par l'enzyme signal peptidase, n'est pas définie très précisément, mais il existe des algorithmes permettant de prédire l'existence et la localisation du site de clivage du précurseur par la peptidase (Nielsen et al., 1997). Il est connu qu'il existe des différences entre les eucaryotes et les procaryotes au niveau des sites de clivage par la signal peptidase (von Heijne et Abrahmsen, 1989), et il ne peut pas être exclu que chez la drosophile, la spécificité de cette enzyme ne soit pas exactement la même que chez les autres eucaryotes.

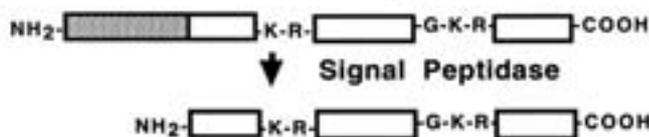
Après leur incorporation dans les granules de sécrétion, les précurseurs subissent un ou plusieurs clivages endoprotéolytiques par des convertases, qui sont des endoprotéinases qui coupent le propeptide du côté carboxyl des acides aminés basiques (Lys, Arg), et presque toujours après un résidu Arg. Le clivage se réalise surtout après les paires Lys-Arg, mais peut s'effectuer aussi après des paires Arg-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys et quelquefois après un seul acide aminé Lys ou Arg (Rholam et al., 1995 ; Veenstra, 2000).

La spécificité cellulaire des convertases peut être différente, ce qui fait qu'un même précurseur peut produire des neuropeptides de structures variées dans des cellules différentes (Mojsov et al., 1986). Les acides aminés basiques qui ont été utilisés pour indiquer aux convertases où cliver le propeptide sont ensuite enlevés par une carboxypeptidase (E ou H). Ces exopeptidases éliminent systématiquement tous les résidus Arg et Lys qui se trouvent à la partie C-terminale des chaînes peptidiques dans les vésicules de sécrétion. Enfin, le propeptide peut subir une amidation à la partie C-terminale du précurseur, ou des modifications de l'extrémité N-terminale comme l'acétylation ou la formation de résidu pyroglutamate. En général, l'action des carboxypeptidases E ou H et l'action des enzymes permettant l'amidation C-terminale sont toujours complètes, sauf pour quelques exceptions (Kollisch et al., 2000).

L'amidation à l'extrémité C-terminale est très commune aux neuropeptides des insectes et l'absence de cette amidation rend généralement le neuropeptide biologiquement inactif (Taghert et al., 2001). Cette modification est obtenue à partir d'un résidu Gly en position C-terminale du précurseur qui est changé en amide par deux enzymes, qui chez les vertébrés sont connues sous le nom de complexe PAM (Peptidyl α -Amidating Monooxygenase). Chez la drosophile, ce complexe consiste en deux protéines codées par deux gènes différents. La réaction d' α -amidation se réalise en deux étapes : le peptide avec le résidu Glycine exposé est hydroxylé par la PHM (Peptidylglycine- α -Hydroxylating Monooxygénase) pour donner la peptidyl- α -hydroglycine qui est ensuite clivée par la seconde enzyme PAL (Peptidyl α -hydroglycine- α -Amidating Lyase) pour former le peptide α -amidé (Kolhekar et al., 1997).

Maturation des précurseurs des hormones peptidiques

Dans le Réticulum Endoplasmatique:



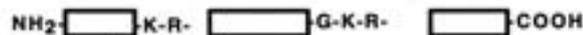
N.B.:

G = Glycine
 R = Arginine
 K = Lysine

Dans les granules de sécrétion:



↓ Endoproteïnase (Convertase)



↓ Carboxypeptidase E (CPE ou CPH)



↓ Peptidyl Amidating Monooxygenase (PAM)



Figure 34 : Représentation des différentes étapes de maturation des précurseurs de neuropeptides dans le réticulum endoplasmique et les granules de sécrétion des cellules peptidergiques.

Lorsqu'elle est ectopique, l'expression d'un précurseur de neuropeptides ne suffit pas pour que la cellule, qui en est le siège, sécrète le neuropeptide. Il faut également que la cellule exprime toutes les protéines nécessaires à la maturation du précurseur, notamment les convertases, carboxypeptidases et très souvent les enzymes d'amidation C-terminale. Ainsi, si

nous voulons faire surexprimer l'IFamide et l'endomorphine de drosophile, nous devons faire surexprimer non seulement son précurseur, mais également toutes les enzymes impliquées.

D'une manière générale, un gène qu'il soit artificiel ou non, existe non seulement par sa séquence codante mais également par des séquences régulatrices permettant de diriger spatialement et temporellement son expression dans différents tissus ou types de cellules. Plutôt que d'utiliser un promoteur spécifique, nous avons préféré utiliser le système d'expression UAS_G-Gal4 qui permet l'utilisation d'une large variété de promoteurs de neuropeptides ou d'enhancer traps-Gal4 (pièges à séquences régulatrices) pour faire exprimer le précurseur artificiel essentiellement ou exclusivement dans des cellules ayant la machinerie cellulaire nécessaire pour produire un neuropeptide biologiquement actif (Brand et Perrimon 1993).

RESULTATS

Nous présentons dans ce chapitre, la construction d'un gène artificiel codant un précurseur contenant plusieurs copies de neuropeptides et son expression dans le système nerveux.

1- Construction du précurseur artificiel de neuropeptides

1-1 Peptide signal et site de Kozak

Il paraît peu probable que le peptide signal puisse contribuer à l'activité biologique du peptide final; ainsi, nous avons décidé d'utiliser un peptide signal déjà utilisé dans les cellules peptidergiques chez la drosophile. Pour cela, nous avons choisi de prendre le peptide signal de la corazonine du fait que ce neuropeptide est exprimé en quantité relativement importante et par un nombre limité de cellules neuroendocrines et de neurones. De plus, la corazonine a été structurellement identifiée chez la drosophile (Veenstra, 1994) et son précurseur est l'un des seuls précurseurs de neuropeptide pour lequel on connait exactement le site où le peptide signal est clivé. Le clivage par la signal peptidase ne peut se faire qu'à l'extrémité N-terminale de la corazonine et ainsi le site de clivage du peptide signal de notre précurseur artificiel devrait être correct. De façon identique, nous avons utilisé le site de Kozak du précurseur de la corazonine pour permettre une bonne traduction des messages codant le précurseur artificiel de neuropeptides.

1-2 Propeptide de l'IFamide et de la drosoendomorphine

Pour le reste du prépropeptide, nous avons voulu produire un précurseur qui soit aussi efficace que possible, c'est-à-dire qu'il puisse subir toutes les modifications et nous avons essayé de construire un gène qui code plusieurs copies du même peptide. Nous avons choisi comme neuropeptide spécifique l'IFamide qui est un neuropeptide naturel de la drosophile. Nous avons ajouté un second peptide "étranger" afin de pouvoir détecter l'expression et le traitement du gène artificiel de neuropeptides de façon indépendante de l'IFamide. Ce second neuropeptide du précurseur est un peptide de onze acides aminés que nous avons appelé, la drosoendomorphine et dont les derniers résidus sont identiques à ceux de l'endomorphine-1. Nous avons choisi ce neuropeptide pour deux raisons. Premièrement, c'est un neuropeptide de mammifères qui n'est pas codé par le génome de la drosophile et deuxièmement, ce

neuropeptide possède également une extrémité C-terminale amidée qui nécessite donc les mêmes processus de maturation que l'IFamide. Les deux séquences peptidiques sont séparées par des sites de clivage de convertase Lys-Arg dont la mise en jeu devrait conduire à l'isolement correct des deux peptides (Veenstra, 2000). Des résidus Glycine ont été rajoutés aux extrémités C-terminales des séquences peptidiques pour pouvoir être transformés en amide ultérieurement.

Il a été suggéré que la présence de plusieurs acides aminés acides (Asp et Glu) observés dans les précurseurs de neuropeptides pourrait être importante pour la neutralisation des acides aminés dibasiques (Lys et Arg) associés aux sites de clivage des convertases (Schaefer et al., 1985). Nous avons analysé les séquences des précurseurs de neuropeptide chez la drosophile et avons constaté une certaine neutralité biochimique que nous avons voulu respecter dans la construction de la séquence du précurseur artificiel de neuropeptides. Ces observations suggèrent que les précurseurs de neuropeptide possédant un nombre important de charges positives sont sujets à des anomalies de maturations.

Dans notre précurseur artificiel, les copies de neuropeptides sont flanquées de chaque côté par les deux résidus Lys-Arg. Étant donné que l'IFamide possède dans sa séquence deux autres résidus basiques et pas de résidu acide, le polypeptide résultant aurait une très forte charge positive. C'est pour cette raison que nous avons ajouté 6 acides aminés acides (Asp ou Glu) à chaque extrémité N-terminale de la drosoendomorphine afin de neutraliser la chaîne polypeptidique.

Nous avons espéré construire un large précurseur avec de nombreuses copies de chacun des deux peptides. Initialement, nous pensions assembler directement le gène mais par la suite, nous avons dû utiliser le site de restriction Hga I, dont le clivage donne un fragment contenant une copie de chaque neuropeptide, pour ainsi augmenter le nombre de copies des peptides dans la séquence finale. Malgré de nombreuses tentatives, nous avons obtenu un précurseur artificiel contenant seulement 2 copies du neuropeptide IFamide et 3 copies de la drosoendomorphine comme le montre la figure de la page suivante (figure 35).

de la souche originelle et avons obtenu cette fois, plusieurs lignées indépendantes avec l'élément P inséré sur des chromosomes différents. Ensuite pour augmenter le nombre de copies du gène artificiel de neuropeptides, nous avons réalisé le croisement entre la lignée homozygote UAS-GAN qui porte l'élément P sur le chromosome 2 avec la lignée homozygote UAS-GAN qui porte l'élément P sur le chromosome 3. Après recombinaison, nous avons obtenu une souche homozygote, avec les éléments P{UAS-GAN} insérés sur les chromosomes 2 et 3 et qui donc possède 4 copies du gène artificiel de neuropeptide.

Afin d'optimiser l'expression du GAN, nous avons utilisé une approche basée sur le système UAS-Gal4 (Hassan et al., 2000). Cette méthode introduit une étape d'amplification entre une lignée enhancer trap-Gal4 et UAS-GAN via la construction UAS-Gal4. Pour cela, nous avons réalisé le croisement entre deux lignées homozygotes possédant respectivement les constructions UAS-GAN et UAS-Gal4 insérées sur le chromosome 2. La lignée homozygote résultante, après recombinaison, a été ensuite croisée avec différentes lignées enhancer trap-Gal4 pour surexprimer le gène artificiel de neuropeptide. Donc, dans les cellules, l'enhancer spécifique active l'expression du facteur de transcription de levure Gal4, ce qui entraîne la synthèse de protéine GAL4 qui se liera aux sites d'activation en amont des constructions UAS-Gal4 et UAS-GAN. Par la suite, il y aura production d'une grande quantité de protéines GAL4 et, donc vraisemblablement, d'une grande quantité du précurseur de neuropeptides. Ainsi, le signal se propage tout seul par auto-activation de Gal4. De plus, le niveau d'expression de la protéine GAL4 étant très haut, active et maintient la transcription à un niveau élevé (Fischer et al., 1988). Dans ces conditions, le gène artificiel de neuropeptides devrait être activé de façon conséquente. Il est à noter que l'expression de GAL4 n'a pas d'effet sur le développement de la drosophile (Brand et Perrimon, 1993).

2-2- Lignées UAS-gène IFamide

La construction P{UAS-Gène IFamide} a été également insérée dans le génome de la drosophile. Pour cela, environ 1440 embryons au total ont été injectés. Sur les 98 larves qui ont émergé, 42 individus se sont développés jusqu'aux stades adultes. Nous avons obtenu deux lignées indépendantes de transformants portant l'élément P, contenant le gène de l'IFamide, situés sur le chromosome 2, mais dont une lignée est létale lorsque l'élément P est à l'état homozygote. Initialement, quand nous avons réalisé le croisement de ces lignées avec celles qui portent le promoteur de la corazonine sous la dépendance du facteur de transcription Gal4, nous n'avons pas pu visualiser l'expression du peptide IFamide dans les cellules à corazonine. La présence de l'élément P{UAS-Gène IFamide} dans le génome de

ces 2 lignées de transformants, a été confirmée par PCR sur des embryons avec une amorce du vecteur pP{UAST} et une amorce du gène de l'IFamide. Nous avons donc remobilisé l'élément P pour éviter cet effet négatif de la position de l'élément P{UAS-Gène IFamide} sur l'expression du gène de l'IFamide.

3- Analyse de l'expression du gène artificiel

Ayant opté pour l'utilisation du système UAS-Gal4 pour induire l'expression du GAN, nous avons le choix d'utiliser plusieurs lignées qui expriment le facteur de transcription Gal4 : d'un côté, des souches qui expriment Gal4 de façon générale dans le système nerveux, et de l'autre, des souches qui expriment Gal4 plus particulièrement dans des cellules peptidergiques.

Nous avons, dans un premier temps, exprimé le gène artificiel de neuropeptides dans tous les neurones du système nerveux central avec l'aide de deux lignées Gal4, la lignée *elav*-Gal4 et la lignée *appl*-Gal4. Le gène *elav* (embryonic lethal abnormal vision) est exprimé dans tous les neurones juste après que la différenciation ne commence. Il continue à être exprimé à tous les stades de développement (Robinow et White, 1988). Le gène *appl* (alzheimer peptide precursor-like) chez la drosophile code l'homologue de l'APP (b-Amyloid Precursor Protein) de l'homme (Luo et collaborateurs, 1990). La protéine est également détectée dans tous les neurones du système nerveux central et périphérique. Lorsque nous avons réalisé le croisement entre les lignées *elav*-Gal4 et *appl*-Gal4 respectivement, avec la lignée UAS-GFP, l'expression panneurale de Gal4 dans les deux souches a été confirmée. Nous avons ensuite croisé ces deux lignées avec la lignée UAS-GAN et analysé l'expression du GAN avec la technique d'immunofluorescence sur le système nerveux de larves en utilisant des anticorps dirigés respectivement contre l'endomorphine-1 de vertébrés et l'IFamide.

L'expression de l'IFamide est facilement détectable dans les quatre neurones à IFamide, mais très faiblement détectable ailleurs. En effet, nous avons rarement trouvé de l'immunoréactivité en dehors des 4 neurones à IFamide, bien qu'occasionnellement nous ayons observé des signaux faibles dans le protocerebrum latéral dans les larges cellules neuroendocrines exprimant le neuropeptide corazonine (résultats non montrés).

Par contre, quand nous avons utilisé l'anticorps endomorphine-1, généreusement fourni par les Drs Ciofi et Tramu, nous n'avons visualisé qu'un petit nombre de neurones faiblement immunoréactifs, dont la plupart paraissent être des neurones peptidergiques identifiables (Figure 36). Ceci suggère que l'anticorps ne reconnaît pas le précurseur non

transformé. Ceci était attendu, car en général, les anticorps dirigés contre des extrémités C-terminales des neuropeptides relativement petits (ce qui est le cas pour nos anticorps), reconnaissent très rarement les extrémités C-terminales non amidées, ou les différents produits intermédiaires de biosynthèse comme les analogues des extrémités C-terminales Gly, Gly-Lys, ou Gly-Lys-Arg.

Ainsi, notre criblage initial de l'expression du gène artificiel de neuropeptides a montré une immunoréactivité très faible. Pour détecter des neurones qui possèdent l'immunoréactivité spécifique des neuropeptides issus du gène artificiel de neuropeptides, nous ne pouvions employer l'anticorps anti-IFamide. Nous étions donc obligé d'utiliser les anticorps anti-endomorphine-1 et ces derniers à une concentration élevée (1/2000). Cependant, à cette concentration, les anticorps anti-endomorphine-1 semblent reconnaître d'autres neuropeptides, et marquent notamment plusieurs neurones qui expriment le FMRFamide. Il semble s'agir d'une réaction croisée entre l'anti-endomorphine-1 et le FMRFamide qui serait due aux similarités existant entre l'endomorphine-1 (YPNFamide) et le FMRFamide. Bien que limitées à l'extrémité Famide et à la ressemblance du premier résidu (Y et F), ces similarités paraissent suffisantes pour induire une réaction croisée visible en immunofluorescence. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons réalisé la pré-absorption de l'anticorps endomorphine-1 sur une colonne d'affinité avec la FMRFamide ce qui a permis de diminuer fortement, mais pas complètement, sa réactivité envers les neurones FMRFamide. Indépendamment du fait que ces anticorps endomorphine-1 soient purifiés par affinité, l'immunoréactivité reste toujours faible.

Ensuite, nous avons utilisé ces lignées enhancer trap-Gal4 que nous avons croisées avec la lignée homozygote possédant la construction UAS-GAN/UAS-Gal4. L'expression du gène artificiel de neuropeptides, comme en atteste l'immunoréactivité à l'endomorphine-1 (Figure 36), est nettement augmentée quand le transgène UAS-Gal4 a été inclus dans les mouches. Ainsi, comme on a pu s'attendre, la quantité de Gal4 a été augmentée ce qui active la transcription des gènes codant le précurseur de neuropeptides et la protéine GAL4, protéine qui à son tour réactive la transcription et ainsi indirectement augmente la production d'ARNm codant le gène artificiel de neuropeptides. Même après l'utilisation de ce système d'amplification du signal, nous ne détectons peu ou pas d'immunoréactivité pour l'IFamide, ce qui démontre que l'anticorps anti-IFamide reconnaît très mal les cellules qui expriment le gène artificiel de neuropeptides.

Figure 36 : Analyse de l'expression du gène artificiel de neuropeptides (GAN)

A- *promCrz-Gal4 x UAS-GAN* - expression de la drosoendomorphine révélée par un anti-endomorphine-1 de vertébrés dans le système nerveux de larve de troisième stade. On note une immunoréactivité drosoendomorphine très faible dans les cellules à corazonine mais néanmoins visible.

B- Souche sauvage - expression de la corazonine, dans deux paires de trois cellules neurosécrétrices du protocerebrum latéral et dans huit paires de cellules dans le ganglion thoraco-abdominal, révélée par un anti-corazonine dans un cerveau de larve.

C- *promCrz-Gal4 x UAS-GAN/UAS-Gal4* - expression de la drosoendomorphine révélée par un anti-endomorphine-1. On observe une immunoréactivité drosoendomorphine encore plus importante dans les cellules à corazonine comparée à celle observée dans la photo **A** .

D- *appl-Gal4 x UAS-GAN/UAS-Gal4* - expression de la drosoendomorphine révélée par un anti-drosoendomorphine. On constate un nombre important de cellules immunoréactives dont certaines sont des cellules peptidergiques identifiables.

E- *elav-Gal4 x UAS-GAN/UAS-Gal4* - expression de la drosoendomorphine révélée par un anti-drosoendomorphine. On observe, parmi les nombreuses cellules immunoréactives, les quatre cellules à IFamide ainsi que leurs axones ainsi que les cellules à corazonine.

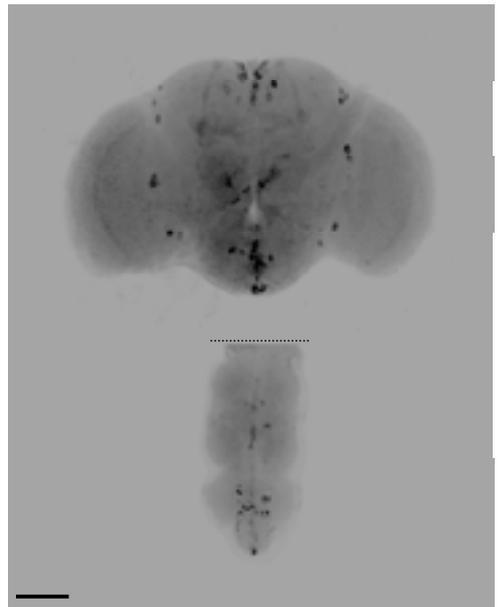
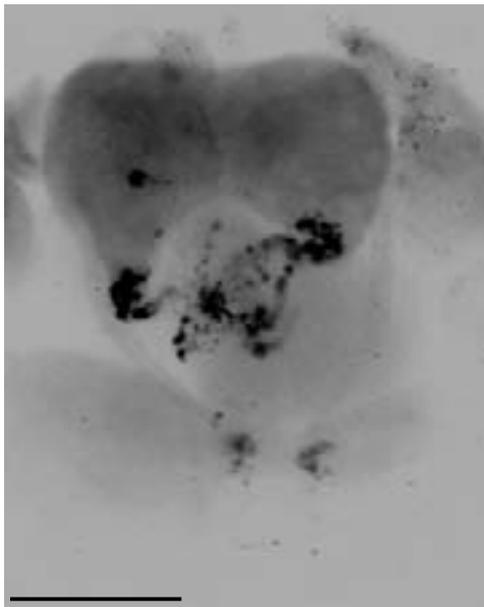
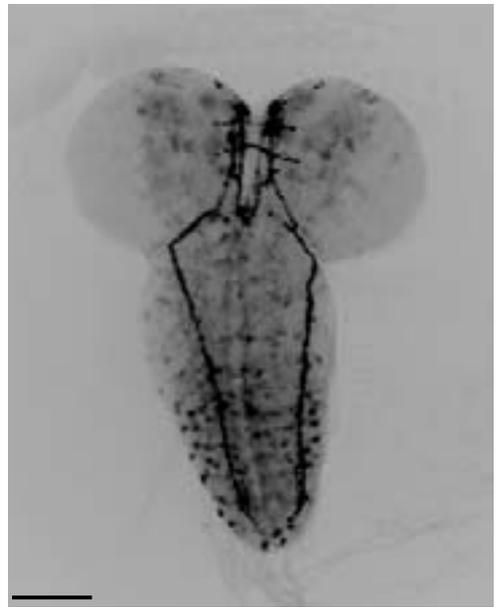
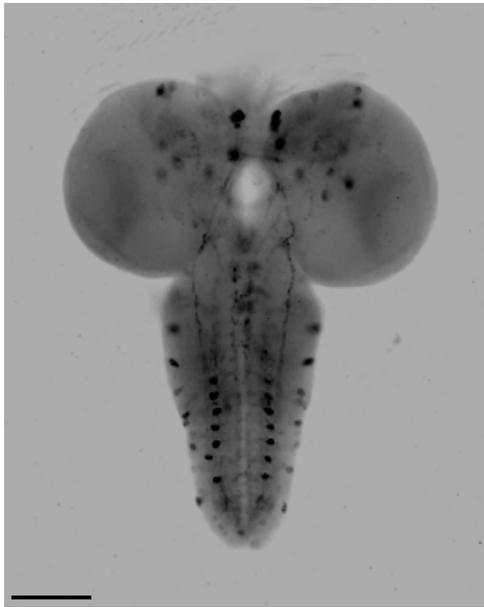
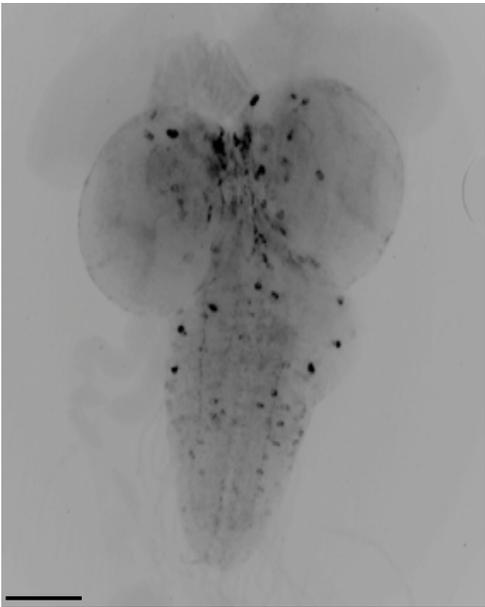
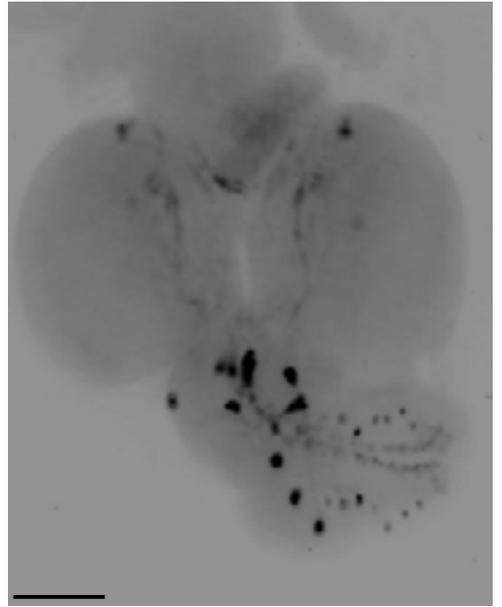
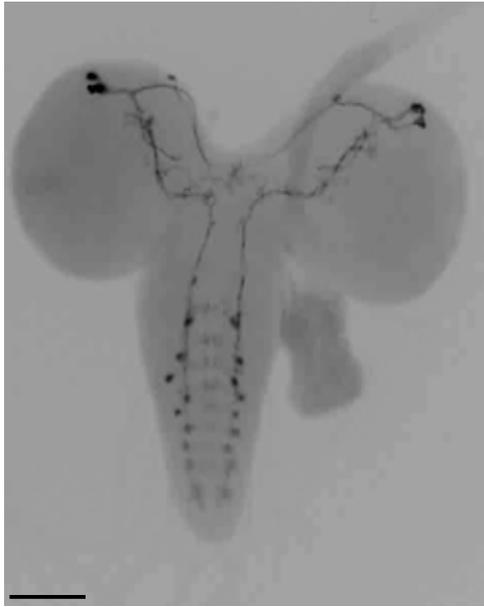
F- *elav-Gal4 x UAS-gène IFamide* - expression du neuropeptide IFamide révélée par un anti-IFamide. Le marquage met en évidence un nombre plus important de cellules exprimant le gène de l'IFamide naturel comparé à celles qui expriment le gène artificiel de neuropeptides.

G- *promIFa-Gal4 x UAS-GAN/UAS-Gal4* - expression de la drosoendomorphine révélée par un anti-drosoendomorphine. L'immunoréactivité drosoendomorphine est mise en évidence uniquement dans les quatre cellules à IFamide ainsi que dans leurs axones. On constate que les corps cardiaques, situés au-dessus des lobes du protocérébron, ne sont pas marqués.

H- *promAKH-Gal4 x UAS-GAN/UAS-Gal4* - expression de la drosoendomorphine révélée par un anti-drosoendomorphine. On visualise les cellules à AKH dans les corps cardiaques et le matériel immunoréactif pouvant être libéré dans l'hémolymphe.

I- *elav-Gal4 x UAS-GAN/UAS-Gal4* - expression de la drosoendomorphine dans un système nerveux d'adulte de 5 jours révélée par un anti-drosoendomorphine. Le marquage est observé dans un nombre limité de neurones dans le cerveau et le ganglion thoracique.

La barre d'échelle représente 100 μ m.



Nous avons, par la suite, préparé des anticorps dirigés contre la drosoendomorphine, en espérant obtenir un immunosérum plus spécifique et plus sensible. Sur les deux lapines immunisées, l'une a produit des anticorps qui ont dès le début (premières saignées testées) réagi avec les neurones à FMRFamide, tandis que les anticorps de la deuxième lapine n'ont induit le même résultat qu'après la quatrième saignée. Nous avons donc utilisé les anticorps de la troisième saignée de cette dernière lapine (lapine ATH, Janvier 2002) pour nos analyses immunohistologiques de l'expression du GAN. Les résultats montrent un nombre plus important de neurones immunoréactifs dans le cerveau et dans le ganglion thoracique de la larve de troisième stade (Figure 36). Dans le système nerveux, plusieurs cellules fortement marquées sont identifiées comme des neurones endocrines parce que les axones immunoréactifs se projettent dans les organes neurohémaux comme les corps cardiaques ou les organes neurohémaux dorsaux associés au ganglion thoraco-abdominal. Certains neurones ont une localisation qui rappelle celle de cellules peptidergiques telles que les cellules à corazonine. Néanmoins, nous n'avons prouvé l'identité que pour les deux interneurones exprimant le FMRFamide dans le ganglion sous-œsophagien et pour les cellules neuroendocrines du ganglion thoracique qui sont, remarquons-le, particulièrement immunoréactives.

Nous avons réalisé quelques marquages avec l'anticorps anti-drosoendomorphine sur des systèmes nerveux d'adultes mâles et femelles de 5 à 10 jours et nous n'avons observé de l'immunoréactivité que dans un nombre limité de neurones dans le cerveau et dans le ganglion thoracique comparé à ceux qui sont marqués chez la larve (Figure 36). L'immunoréactivité est clairement présente dans des corps cellulaires mais également dans les régions neuropilaires comme les corps pédonculés, les lobes antennaires et les lobes optiques. Il a été préalablement décrit par Helfrich-Forster et al., (2000) que lorsque le gène codant le neuropeptide PDF ("Pigment Dispersing factor") est exprimé de façon ectopique par l'intermédiaire de la lignée enhancer-trap *elav-Gal4*, les anti-PDF marque un nombre plus important de neurones chez la larve que chez l'adulte et nos résultats confirment ces observations. Il est possible que le nombre de cellules exprimant les enzymes permettant les modifications post-traductionnelles (par exemple l'amidation C-terminale des peptides) diminue au stade de développement adulte ce qui pourrait expliquer pourquoi notre anticorps anti-drosoendomorphine qui ne détecte que les neuropeptides correctement amidés, marque peu de neurones.

Il est intéressant de noter que lorsque nous avons effectué le croisement entre les lignées, *elav-Gal4* et *appl-Gal4*, qui expriment toutes les deux Gal4 de façon panneurale, avec

la lignée UAS-GAN/UAS-Gal4, les marquages anti-drosoendomorphine ne sont pas similaires. Initialement, nous nous attendions à observer le même nombre de cellules exprimant le gène artificiel de neuropeptides avec également la même intensité de marquage, mais il s'est avéré que l'anti-drosoendomorphine reconnaît un nombre de neurones plus important avec la lignée enhancer trap appl-Gal4.

Dans un second temps, nous avons étudié l'expression du gène artificiel de neuropeptides en utilisant des souches qui expriment Gal4 sous le contrôle d'un promoteur d'un gène codant un neuropeptide. Dans notre laboratoire, nous possédons trois lignées de ce genre. Ce sont les lignées promCrz-Gal4 et promAKH-Gal4, créés par le Dr Isabel, qui expriment Gal4 respectivement dans les cellules à corazonine et à AKH (AdipoKinétique Hormone), ainsi que la lignée promIFa-Gal4. Lorsque nous avons croisé ces lignées avec la lignée UAS-GAN/UAS-Gal4, les résultats ont montré que le gène artificiel de neuropeptides était exprimé dans toutes les cellules où Gal4 était exprimé.

Plus précisément, quand nous réalisons le croisement entre la lignée promAKH-Gal4 et la lignée UAS-GAN/UAS-Gal4, nous détectons l'immunoréactivité révélant la drosoendomorphine dans des cellules à AKH localisées dans les corps cardiaques (Figure 36). Ces derniers sont des organes neurohémaux qui stockent et libèrent de nombreuses neurohormones dans l'hémolymphe. Il est à noter que nous n'avons jamais observé une immunoréactivité drosoendomorphine aussi forte dans les cellules des corps cardiaques en utilisant les lignées elav-Gal4 et appl-Gal4. Ces résultats suggèrent que les produits matures du gène artificiel de neuropeptides peuvent être libérés dans l'hémolymphe et ainsi, il est possible que ces neuropeptides artificiels puissent agir sur des organes cibles.

Lorsque nous effectuons le croisement de la lignée promCrz-Gal4 avec la lignée UAS-GAN/UAS-Gal4, nous trouvons l'immunoréactivité drosoendomorphine dans deux paires de trois cellules neurosécrétrices du protocerebrum latéral et dans huit paires de cellules dans le ganglion thoraco-abdominal. Cependant, l'immunoréactivité n'est pas assez forte pour bien visualiser les axones se projetant dans les corps cardiaques ou dans les structures neurohémales associées au ganglion thoraco-abdominal.

De façon attendue, nous avons également détecté la drosoendomorphine dans les 4 neurones à IFamide, quand nous réalisons le croisement de la lignée promIFa-Gal4 avec la lignée UAS-GAN/UAS-Gal4 (Figure 36). Néanmoins, l'immunoréactivité est faible comparée à celle qui est détectée dans ces mêmes cellules avec l'anticorps dirigé contre le peptide IFamide.

Comme précédemment, l'anticorps anti-IFamide, révèle l'IFamide endogène, mais ne marque significativement aucune cellule peptidergique chez les mouches dans lesquelles les promoteurs de neuropeptides sont utilisés pour diriger l'expression du gène artificiel de neuropeptides.

4- Analyse de l'expression du gène de l'IFamide

Pour pouvoir comparer l'expression du gène codant le précurseur artificiel de neuropeptides avec celle du gène codant le précurseur naturel du neuropeptide IFamide, nous avons créé une souche de drosophiles qui possède un élément P qui porte la séquence codante du gène de l'IFamide sous la dépendance de la séquence UAS.

Notre première expérience a été d'utiliser la lignée *elav-Gal4* pour exprimer de manière ectopique le gène de l'IFamide. Dans le cerveau de larve du troisième stade, nous observons quelques centaines de neurones immunoréactifs avec l'anticorps anti-IFamide (Figure 36). Un certain nombre d'entre eux ont un patron d'expression de neuropeptides connus et sont facilement reconnaissables. Cependant la majorité des neurones ne sont pas aisément identifiables.

L'obtention tardive de ces lignées P{UAS-Gène IFamide} ne nous a pas permis d'utiliser les différentes lignées Gal4 employées précédemment. Il sera intéressant de détecter chez l'adulte, par la technique d'immunohistochimie, les neurones qui expriment l'IFamide et d'analyser les effets d'une telle expression ectopique sur la physiologie et/ou le comportement des drosophiles mâles et femelles.

Toutefois, nos observations permettent de dire que le nombre de cellules exprimant le gène de l'IFamide naturel est bien plus important que celui des neurones qui expriment le gène artificiel de neuropeptide et ainsi, de conclure que la séquence entière du gène de l'IFamide paraît être nécessaire pour une forte expression du gène.

DISCUSSION

Bien que l'expression du gène artificiel de neuropeptides paraisse modérée, le premier constat est que nous sommes parvenu à le faire exprimer. Nous savons que pour obtenir un neuropeptide produit à partir d'un gène codant un précurseur de neuropeptide, de nombreux processus moléculaires et biochimiques doivent être réalisés correctement (Taghert et Veenstra, 2003) et il n'est donc pas surprenant que tous ne se déroulent pas encore de façon optimale pour notre gène artificiel.

Premièrement, pour permettre une traduction significative des ARNm, ces derniers doivent être transcrits en quantité suffisante à partir d'un gène et ces messagers doivent être stables. Certains arguments suggèrent que l'étape de transcription du gène artificiel de neuropeptide n'est pas optimale. En effet, quand nous réalisons le croisement de différentes lignées enhancer trap avec des lignées portant le gène artificiel, peu de neurones exprimant les neuropeptides artificiels ont été détectés par immunohistochimie et ceci, aussi bien avec les anticorps dirigés contre l'IFamide qu'avec ceux dirigés contre la drosoendomorphine. On pourrait penser que la faible expression de notre gène est due à une production insuffisante des ARNm ou que ceux-ci soient très instables. L'utilisation de la construction UAS-Gal4 permet tout de même de détecter un nombre plus important de cellules immunoréactives avec l'anti-drosoendomorphine ce qui suggère qu'une plus grande quantité de messagers issus du gène artificiel de neuropeptide est produite entraînant ainsi une production plus importante de neuropeptides artificiels.

Afin d'optimiser la transcription des ARNm, nous avons utilisé, pour la construction du précurseur, les codons connus pour être préférentiellement utilisés. En effet, il a été montré qu'il y a une corrélation entre la nature des codons utilisés et le niveau d'expression des gènes. Après la transcription des ARNm, ces derniers doivent être efficacement traduits. Chez la drosophile, les codons les plus fréquemment utilisés sont ceux qui sont reconnus par les ARN de transfert les plus abondants et il a été également montré que la disponibilité de ces ARNt varie en fonction du stade de développement (Moriyama et Powell, 1997). Nous avons choisi les codons majoritairement présents chez la drosophile adulte, pour permettre une traduction efficace entraînant ainsi un niveau abondant d'expression des neuropeptides.

Après la traduction, le précurseur doit migrer dans le réticulum endoplasmique et le Golgi. Nos anticorps ne reconnaissent que les produits maturés du précurseur ; il apparaît que dans la phase post-traductionnelle, celui-ci a bien migré au travers du réticulum

endoplasmique du Golgi pour entrer dans les vésicules de sécrétion. Notre choix du peptide signal s'avère donc justifié. En effet, nous avons choisi d'utiliser le peptide signal d'un précurseur de neuropeptides connu, celui de la corazonine, pour lequel nous savions qu'il fonctionnerait comme un peptide signal aussi bien dans les neurones que dans les cellules neuroendocrines. Nous avons pensé que le fait d'utiliser le peptide signal du précurseur de la corazonine dans la construction du précurseur artificiel de neuropeptides devait assurer une bonne entrée du prépropeptide dans le réticulum endoplasmique. Bien que nous n'ayons pas de moyen pour analyser la quantité de précurseur qui entre dans le réticulum endoplasmique, nous pensons, a priori, que cette étape ne pose pas de problème majeur.

Après le réticulum endoplasmique, le précurseur doit passer dans l'appareil de Golgi et par la suite migrer dans les vésicules de sécrétion. Actuellement, nous ne savons pas si des signaux précis sont nécessaires lors de l'individualisation des vésicules de sécrétion à partir du Golgi. Néanmoins certains exemples, comme celui du précurseur de l'hormone de ponte chez le mollusque *Aplysia*, montrent que des sorties différentielles (Fischer et al., 1988) ont lieu dans certains cas. Ainsi il est possible que le transfert dans les granules de sécrétion ne soit pas parfait.

Une fois à l'intérieur des granules de sécrétion, différentes modifications post-traductionnelles ont lieu. Le précurseur doit être clivé par une ou des convertases, puis les acides aminés basiques à l'extrémité C-terminale doivent être enlevés par une carboxypeptidase et finalement le résidu Glycine de l'extrémité C-terminale du peptide doit être converti en amide C-terminale par le complexe PAM. Parmi ces différentes réactions, le clivage par les convertases est le moins prévisible. Un site de clivage classique consiste en une séquence Lys-Arg, mais certaines convertases ont des spécificités différentes, comme entre autres, cliver après un seul résidu Arg dans un contexte favorable. Chez les vertébrés et les insectes, des règles ont été décrites, permettant de prédire l'efficacité d'un site de clivage précis (Devi, 1991 ; Rholam et al., 1995 ; Veenstra, 2000). A l'intérieur du précurseur, nous avons désigné les sites de clivage de convertase qui ne devraient poser aucune difficulté pour être utilisés, à savoir ceux qui contiennent la séquence Lys-Arg suivie soit par le résidu Ala, soit par le résidu Asp, tous deux censés faciliter le clivage quand ils suivent une paire Lys-Arg.

En dépit du fait que le précurseur artificiel du neuropeptide puisse produire 3 copies de la drosoendomorphine et 2 copies de l'IFamide, il nous semble peu vraisemblable que cette différence explique pourquoi l'immunoréactivité à l'IFamide est plus faible que celle de la drosoendomorphine dans les neurones exprimant le précurseur artificiel de neuropeptides.

Deux autres interprétations nous paraissent plus vraisemblables : la première est que l'anti-IFamide est significativement moins sensible que l'anti-drosoendomorphine, la seconde, que notre précurseur artificiel de neuropeptides n'est pas clivé de façon optimum par les convertases. Dans le dernier cas, l'immunoréactivité drosoendomorphine que nous observons serait la conséquence de l'action combinée sur le propeptide, de la carboxypeptidase et du complexe PAM qui, même en l'absence de l'activité de convertases, donneraient une séquence C-terminale de l'endomorphine bien reconnaissable par les anti-drosoendomorphine. Nous pensons qu'il est peu plausible qu'une convertase puisse cliver les sites Lys-Arg-Ala-Tyr et pas les sites Lys-Arg-Asp-Asp. Il est admis que de tels sites sont très facilement clivés par les convertases (Devi, 1991 ; Rholam et al., 1995 ; Veenstra, 2000) et nous avons trouvé une faible immunoréactivité IFamide dans quelques neurones exprimant le gène artificiel de neuropeptides, montrant ainsi qu'au moins une quantité de précurseur est modifié par une ou des convertases.

Il est donc possible de penser que l'anti-IFamide est moins sensible que l'anti-drosoendomorphine. En général, les neuropeptides sont présents en forte concentration dans les granules de sécrétion, ce qui permet aux deux sites anticorps d'une immunoglobuline G de s'attacher spécifiquement au peptide contenu dans la vésicule de sécrétion même si l'affinité de la liaison antigène-anticorps est faible. Cependant, quand la concentration de neuropeptide dans les granules de sécrétion diminuera, de moins en moins d'anticorps seront capables d'interagir avec le neuropeptide. De plus, si son affinité est faible, l'anticorps aura tendance à se détacher du neuropeptide. Ainsi, de très faibles concentrations de neuropeptides dans les granules de sécrétion non seulement diminuent le nombre total de sites de liaison des anticorps, mais également rendent les liaisons immunohistologiques pour les anticorps de faible affinité beaucoup plus problématiques. Un autre argument nous pousse à penser que notre anti-IFamide n'a qu'une affinité modérée pour son antigène ; c'est sa faible efficacité dans un système de dosage ELISA, caractéristique qui révèle classiquement la faible affinité d'un anticorps. Toutes ces observations concordent avec l'idée que la faible immunoréactivité IFamide que nous détectons en immunohistochimie, est due à la faible affinité de l'anti-IFamide.

En utilisant le système UAS-Gal4, il a été montré que l'expression ectopique du neuropeptide PDF, est suffisante pour perturber le développement normal de la drosophile ou pour altérer le comportement en général (Helfrich-Forster, 2000). Nous avons donc pensé que le système UAS-Gal4 pourrait permettre l'expression de quantités importantes de neuropeptides, mais cela ne s'est pas avéré être le cas. L'exemple étayant cette déduction est

le fait que les anti-endomorphine-1 soient très immunoréactifs vis-à-vis des neurones FMRFamide, ce qui suggère que seulement de petites quantités d'endomorphine de drosophile sont produites. De plus, lorsque nous avons utilisé les lignées enhancer trap-Gal4 qui expriment toutes les deux Gal4 de façon panneurale, nous observons que l'expression du gène artificiel de neuropeptides n'est pas similaire à celle du gène de l'IFamide, ce qui montre que les quantités de protéines produites par l'intermédiaire du système UAS-Gal4 peuvent varier de façon importante. Ceci peut s'expliquer par le fait que les protéines exprimées par le système UAS-Gal4, comme par exemple le facteur de transcription Gal4, sont en général des protéines qui sont normalement peu abondantes dans les cellules. Or, dans un neurone peptidergique, le précurseur de neuropeptide devrait être le produit principal de la cellule et devrait représenter au moins 10% de la synthèse protéique totale. De plus, nous avons observé que même l'expression du gène naturel de l'IFamide, bien que plus importante que celle du gène artificiel de neuropeptides, est relativement faible. Étant donné que le gène de l'IFamide est normalement exprimé de façon abondante dans les neurones, il se pourrait que le système UAS-Gal4 ne soit pas optimal. Néanmoins, ce système reste flexible par le fait que l'on peut amplifier le signal par le biais de la construction UAS-Gal4 et qu'il est possible d'augmenter le nombre de copies pour les différents éléments P utilisés en créant des souches qui possèdent de multiples insertions de ces derniers.

Nous avons vu que l'expression du gène de l'IFamide de la drosophile est plus importante que celle du gène artificiel de neuropeptides. Cette observation suggère que le système UAS-Gal4 n'est pas uniquement responsable de la faible immunoréactivité obtenue et que certaines séquences dans le précurseur du gène artificiel de neuropeptides sont soit absentes, soit mal construites pour obtenir une forte expression. Ainsi, on peut se poser la question de l'importance de l'intron dans la séquence du gène de l'IFamide, mais également de la signification de la séquence peptidique apparenté au précurseur ou des séquences en amont et en aval du site de polyadénylation ou du site de polyadénylation lui-même. En effet, il n'est pas impossible qu'une séquence, parmi celles qui viennent d'être citées, entraîne une régulation positive de l'expression du gène de l'IFamide et que cette séquence ne soit pas contenue dans la séquence du précurseur de neuropeptides que nous avons construit. Cependant, on sait que la séquence correspondant à la région non traduite en 3' du gène et les séquences situées en amont et en aval du site de polyadénylation (AAUAAA), non seulement affectent l'efficacité du clivage mais affectent également le niveau d'expression d'un promoteur (Carswell et Alwine, 1989 ; Angelichio et al., 1991 ; Huynh et Zieler, 1999). On sait également que les introns peuvent réguler positivement l'expression de gènes dans les

cellules de mammifères et chez les souris transgéniques, probablement parce que les ARNm matures sont exportés de manière plus efficace à partir du noyau (Brinster et al., 1988 ; Buchman et Berg, 1988). Bien qu'actuellement, nous ne sachions pas si cela est le cas chez les insectes, nous avons montré que le gène de l'IFamide de la drosophile contient un intron après la séquence codant le peptide. Si la présence de cet intron permettait de réguler positivement l'expression du gène de l'IFamide, cela expliquerait pourquoi l'immunoréactivité pour le peptide IFamide endogène est bien plus forte que celle de l'IFamide et de la drosoendomorphine artificielle.

Ainsi, même si nous sommes conscients que les raisons de la faible expression du gène artificiel de neuropeptide sont multiples, il y a des arguments qui nous permettent de penser que la raison majeure serait une insuffisante production des ARNm. Néanmoins, l'existence d'une ou plusieurs séquences indispensables pour une bonne maturation du précurseur de neuropeptides ne peut être exclue.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'identification des neuropeptides chez les insectes ainsi que l'approche de leur signification fonctionnelle ont considérablement avancé ces dernières années. Néanmoins, à ce jour, uniquement quelques neuropeptides ont été isolés et séquencés chez la drosophile. Le travail, effectué dans cette thèse, a permis d'accroître nos connaissances sur la leucokinine et l'IFamide de drosophile, deux neuropeptides que nous avons isolés et identifiés.

Nous avons isolé un peptide apparenté à la famille des leucokinines et grâce à la disponibilité de la séquence génomique de la drosophile, nous avons identifié le gène de la leucokinine, nommé *pp*, qui code une seule leucokinine. Bien que l'activité physiologique de la leucokinine chez la drosophile ait été fortement suggérée par des études préalables (O'Donnell et al., 1996 ; Rosay et al., 1997), nous avons pu en outre, grâce à l'isolement du peptide naturel, montrer clairement que : (1) la leucokinine de drosophile peut agir comme une hormone diurétique en augmentant l'excrétion de fluide et (2) ce peptide est vraisemblablement le ligand authentique des récepteurs des tubes de Malpighi puisqu'il agit à des concentrations physiologiques de 0,1 nM (Terhzaz et al., 1999). De toutes les hormones diurétiques identifiées à ce jour, la leucokinine est l'hormone diurétique la plus puissante.

Ce sont les cellules neurosécrétrices du ganglion abdominal qui sécrètent le neuropeptide jusque dans les organes neurohémaux, grâce auxquels il est libéré dans l'hémolymphe et diffuse jusqu'aux tubes de Malpighi (Cantera et Nässel, 1992). Cependant, nous ne montrons pas définitivement que la leucokinine agit comme une hormone car pour cela, il faudrait démontrer qu'elle est libérée dans l'hémolymphe lorsque la diurèse est activée. Ce dernier point est loin d'être résolu et la petite taille de l'insecte ne facilite pas les dosages de la leucokinine présente dans l'hémolymphe. Nous avons également montré que la leucokinine de drosophile augmente les $[Ca^{2+}]_i$ uniquement dans les cellules étoilées des tubes de Malpighi. Récemment, la caractérisation du seul récepteur de la leucokinine a été réalisée et son expression, au niveau des cellules étoilées des tubes de Malpighi, confirme le site d'action de la leucokinine (Radford et al., 2002).

Cependant, même si l'activité physiologique de la leucokinine de drosophile semble bien caractérisée, le fait qu'elle soit produite par d'autres neurones du système nerveux et que son récepteur soit exprimé dans plusieurs neurones suggère également qu'elle posséderait un rôle en tant que neurotransmetteur/neuromodulateur dans le cerveau qui reste toujours à découvrir. Il a été récemment montré que les neurones du protocérébron latéral exprimant la leucokinine se projettent dans les corps pédonculés et ainsi un rôle dans la neuromodulation de l'apprentissage associatif et de la mémorisation leur est suggéré (Herrero et al., 2003). Actuellement, nous ne connaissons pas le rôle des interneurones exprimant la leucokinine dans le ganglion sous-œsophagien. De la même façon que nous avons entrepris l'étude du rôle des cellules à IFamide, il serait intéressant de réaliser la destruction des cellules qui produisent la leucokinine car actuellement il n'y a toujours pas de mutants disponibles. Néanmoins, la proximité de plusieurs éléments P autour du gène *pp* rend la mutagenèse du gène de la leucokinine envisageable.

Depuis de nombreuses années, par des méthodes de coloration des produits de neurosécrétion ainsi que par des études immunohistologiques, la présence d'un noyau de quatre cellules neuroendocrines situées dans la *pars intercerebralis* du cerveau de nombreux insectes avait été montré (Panov, 1976 ; Veenstra et Yanihara, 1984). Cependant jusqu'à notre travail, le ou les peptides responsables de cette immunoréactivité n'avaient pas été isolés.

Dans notre étude, nous avons identifié le peptide IFamide et nous avons montré qu'il est produit exclusivement dans ces quatre mêmes cellules du cerveau. Nous avons pu ensuite identifier le gène de l'IFamide et prouvé que son expression est restreinte à ces quatre mêmes neurones. Généralement, les familles de peptides sont bien conservées chez les différentes espèces d'insectes et ce peptide existe également chez le moustique, *Anopheles gambiae*. Un homologue du peptide IFamide pourrait être présent chez différentes espèces d'insectes car les anticorps dirigés contre l'IFamide reconnaissent des neurones dans la *pars intercerebralis* des insectes et en particulier les quatre neurones préalablement cités. Ces cellules ont été initialement décrites comme étant des cellules neuroendocrines du fait de leurs caractéristiques tinctoriales, mais chez la drosophile, nous montrons que le peptide IFamide n'est pas libéré dans l'hémolymphe et ainsi agirait comme un neurotransmetteur/neuromodulateur. Toutefois, il n'est pas exclu que l'homologue de l'IFamide chez les autres espèces d'insectes puisse agir comme une neurohormone mais cette hypothèse reste à être prouvée.

Par l'intermédiaire des outils génétiques qu'offre la drosophile, comme l'obtention de drosophiles transgéniques, nous avons pu réaliser la destruction des cellules à IFamide et observer une profonde perturbation de l'orientation sexuelle des mâles, à savoir que ces derniers deviennent bisexuels. Le comportement des femelles paraît également être affecté par l'absence des cellules à IFamide et en particulier le comportement locomoteur. Mais des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ces résultats. De même, il serait intéressant d'étudier la réceptivité des femelles et de déterminer si elles présentent également une hyperactivité sexuelle comme cela est observée chez les mâles.

Même si nos travaux permettent de mieux comprendre le rôle des quatre cellules peptidergiques dans le comportement de la drosophile, la fonction exacte de ce peptide est moins évidente. En effet, nous n'avons pas montré de façon définitive que c'est l'IFamide qui est responsable des comportements que nous avons observés. Néanmoins, il sera possible, dans un avenir proche, d'obtenir des drosophiles dont le gène de l'IFamide sera réprimé ou dont le neuropeptide IFamide sera surexprimé. Dans le cas où ces manipulations entraîneraient un (ou des) phénotype(s) facilement détectable(s), les bases moléculaires de ces changements phénotypiques pourraient être analysées au niveau de l'expression des gènes en utilisant des microarrays de drosophile (White et al., 1999 ; Irving et al., 2001). Cette technique permettra de placer le gène de l'IFamide dans un réseau de gènes et donc de proposer un certain nombre de partenaires avec lesquels il réaliserait sa fonction, par exemple dans le contrôle du comportement sexuel de la drosophile ou dans le comportement en général.

Actuellement, différents moyens sont mis en œuvre pour contrôler les populations d'insectes nuisibles et en particulier, des analogues de neuropeptides sont développés pour tenter de perturber les fonctions critiques de ces insectes (Keeley et Hayes, 1987). Pour cela, l'isolement des neuropeptides, la détermination de leurs sites de synthèse et de libération, permettant ainsi de mieux cerner le mode d'action des neuropeptides et donc de mieux évaluer l'effet potentiel d'analogues de neuropeptides, sont nécessaires. Notre travail s'inscrit dans cette démarche car nous avons progressé dans la compréhension de la fonction de deux neuropeptides chez la drosophile et des gènes qui leur sont associés. De plus, nous montrons, pour la première fois, qu'il est possible de construire un gène artificiel codant un précurseur possédant de multiples copies de neuropeptides et de permettre son expression dans le système nerveux de la drosophile. Même si nous ne sommes pas encore en mesure de

maîtriser complètement la surexpression de ces neuropeptides *in vivo*, et qu'un certain nombre de mécanismes moléculaires et biochimiques restent à découvrir, les résultats paraissent tout de même encourageants. Dans ce sens, il sera nécessaire d'effectuer des modifications dans la construction de notre gène artificiel pour optimiser une surexpression et une surlibération des neuropeptides artificiels afin d'étudier leurs effets.

Enfin, nous confirmons que la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, est non seulement un excellent modèle animal pour la recherche fondamentale, mais qu'elle apporte des contributions importantes pour la recherche appliquée (Kornberg et Krasnow, 2000). En outre, le fait que le niveau d'homologie entre le génome d'une drosophile et celui d'un humain soit importante, et le fait que les informations disponibles sur les gènes de drosophile soient très abondantes, font de la mouche un modèle de choix et peut-être un préalable pour des extrapolations fonctionnelles vers la génétique humaine.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.

Agui, N., Granger, N. A., Gilbert, L. I., Bollenbacher, W. E. (1979). Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone : *In vitro* assay of a single neurosecretory cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5694-5698.

Aigaki, T., Fleischmann, I., Chen, P. S., Kubli, E. (1991). Ectopic expression of sex peptide alters reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Neuron* **7**, 557-563.

An, X., Armstrong, J. D., Kaiser, K., and O'Dell, K. M. C. (2000). The effects of ectopic *white* and *transformer* expression on *Drosophila* courtship behavior. *J. Neurogenet.* **14**, 227-243.

Anand, A., Vilella, A., Ryner, L. C., Carlo, T., Goodwin, S. F., Song, H-J., Gailey, D. A., Morales, A., Hall, J. C., Baker, B. S., and Taylor, B. J. (2001). Molecular genetic dissection of the sex-specific and vital functions of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *fruitless*. *Genetics* **158**, 1569-1595.

Angelichio, M. L., Beck, J. A., Johansen, H., Ivey-Hoyle, M. (1991). Comparison of several promoters and polyadenylation signals for use in heterologous gene expression in cultured *Drosophila* cells. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5037-5043.

Audsley, N., Kay, I., Hayes, T. K. and Coast, G. M. (1995). Cross-reactivity studies of CRF-related peptides on insect Malpighian tubules. *Comp. Biochem. Physiol.* **110**, 87-93.

Baggerman, G., Cerstiaens, A., De Loof, A., Schoofs, L. (2002). Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. *J. Biol. Chem.* **277**, 40368-40374.

Bellen, H.J., D'Evelyn, D., Harvey, M., Elledge, S. J. (1992). Isolation of temperature-sensitive diphtheria toxins in yeast and their effects on *Drosophila* cells. *Development* **114**, 787-796.

Bennett, H. P. J., Browne, C. A., Solomon, S. (1981). Purification of two major forms of rat pituitary corticotropin using only reversed-phase liquid chromatography. *Biochemistry* **20**, 4530-4538.

Berghammer, H., and Auer, B. (1993). "Easypreps" : Fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* **14**, 527-528.

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

Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E., Palmiter R. D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* **85**, 836-840.

Brown, B. E., Starrat, A. N. (1975). Isolation of proctolin, a myotropic peptide from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **21**, 1879-1881.

Buchman, A. R., Berg, P. (1988). Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4395-4405.

Burnet, B., Connolly, K., Harrison, B. (1973). Phenocopies of pigmentary and behavioral effects of *yellow* mutant in *Drosophila* induced by α -dimethyltyrosine. *Science* **181**, 1059-1060.

Cabrero P., Radford J.C., Broderick K. E., Costes, L., Veenstra, J. A., Spana, E. P., Davies, S. A., Dow, J. A. T. (2002). The Dh gene of *Drosophila melanogaster* encodes a diuretic peptide that acts through cyclic AMP. *J. Exp. Biol.* **205**, 3799-3807.

Cady, C, Hagedorn H. H. (1999). Effects of putative diuretic factors on intracellular second messenger levels in the Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **45**, 327-337.

Cantera, R., Nässel, D. R. (1992). Segmental peptidergic innervation of abdominals targets in larval and adult dipteran insects revealed with an antiserum against leucokinin I. *Cell Tissue Res.* **269**, 459-471.

Carswell, S. and Alwine, J. (1989). Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4248-4258.

Cavener, D. R. (1987). Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1353-1361.

Cavener, D. R., Ray, S. C. (1991). Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3185-3192.

Charlet, M., Schaller, F. (1976). Blocage de l'exuviation chez la larve d'*Aeshna cyanea* (Insecte Odonate) après électrocoagulation d'un centre neurosécréteur du protocérébron antérieur. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* **283**, 1539.

Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B., Abrams, J. M. (1996). Grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* **10**, 1773-1782.

Chen, Y., Veenstra, J. A., Hagedorn, H. H., Davis, N. T. (1994). Leucokinin and diuretic hormone immunoreactivity of neurons in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and colocalization of this immunoreactivity in lateral neurosecretory cells of abdominal ganglia. *Cell Tissue Res.* **278**, 493-507.

Cheung, C. C., Loi, P. K., Sylwester, A. W., Lee, T. D., Tublitz, N. J. (1992). Primary structure of a cardioactive neuropeptide from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* **313**, 165-168.

Clottens, F. L., Holman, G. M., Coast, G. M., Totty, N. F., Hayes, T. K., Kay, I., Mallet, A. I., Wright, M. S., Chung, J. S., Truong, O. and Bull, D. L. (1994). Isolation and characterization of a diuretic peptide common to the house-fly and stable fly. *Peptides* **15**, 971-979.

Cobb, M., Ferveur, J-F. (1996). Evolution and genetic control of mate recognition and stimulation in *Drosophila*. *Behav. Processes* **35**, 35-34.

Coast, G. M. (1995). Neuropeptides implicated in the control of diuresis in insects. *Peptides* **17**, 327-336.

Coast, G. M. (1995). Synergism between diuretic peptides controlling ion and fluid transport in insect Malpighian tubules. *Regul. Pep.* **57**, 283-296.

Coast, G. M., Webster, S. G., Schegg, K. M., Tobe, S. S. and Schooley, D. A. (2001). The *Drosophila melanogaster* homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. *J. Exp. Biol.* **204**, 1795-1804.

Coons A. H. and Kaplan M. H. (1950). Localization of antigens in tissue culture cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* **91**, 1-13.

Cox, K. J., Tensen, C. P., Van der Schors, R. C., Li, K. W., Van Heerikhuizen, H., Vreugdenhil, E., Geraerts, W. P., Burke, J. F. (1997). Cloning, characterisation, and expression of a G-protein-coupled receptor from *Lymnea stagnalis* and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. *J. Neuroscience* **17**, 1197-1205.

Davies, S. A., Huesmann, G. R., Maddrell, S., O'Donnell, M. J., Skaer, N., Dow, J. A. T., Tublitz, N. J. (1995). CAP2b, a cardioacceleratory peptide, is present in *Drosophila* and stimulates tubule fluid secretion via cGMP. *Am. J. Physiol.* **269**, 1321-1326.

Davies, S. A., Stewart, E. J., Huesmann, G. R., Skaer, N. J., Maddrell, S. H. M., Tublitz, N. J., Dow, J. A. T. (1997). Neuropeptide stimulation of the nitric oxide signaling pathway in *Drosophila melanogaster* Malpighian tubules. *Am. J. Physiol.* **273**, 823-827.

Devi, L. (1991). Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett.* **280**, 189-194.

Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y., Moerner, W. E. (1997). On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355-358.

Dow, J. A. T., Maddrell, S. H. P., Görtz, A., Skaer, N. J. V., Brogan, S., Kaiser, K. (1994). The Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. *J. exp. Biol.* **197**, 421-428.

Dow, J. A. T. and Davies, S. A. (2001). The *Drosophila melanogaster* Malpighian tubule. *Adv. Insect Physiol.* **28**, 1-83.

Duve, H. (1978). The presence of a hypoglucemic and hypotrehalocemic hormone in the neurosecretory system of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **36**, 102-110.

Duve, H., Thorpe, A. (1979). Immunofluorescent localization of insulin-like material in the median neurosecretory cells of the blowfly, *Calliphora vomitoria* (Diptera). *Cell Tissue Res.* **200**,187-91.

Ferveur, J-F., Stoerkuhl, K. F., Stocker, R. F., and Greenspan, R. J. (1995). Genetic feminization of brain structures and changed sexual orientation in male *Drosophila*. *Science* **267**, 902-905.

Ferveur, J-F. (1997). The pheromonal role of cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **19**, 353-358.

Ferveur, J-F., Savarit, F., O'Kane, C. J., Sureau, G., Greenspan, R. J., and Jallon, J-M. (1997). Genetic feminization of pheromones and its behavioral consequences in *Drosophila* males. *Science* **276**, 1555-1558.

Ferveur, J-F., Greenspan, R. (1998). Courtship behavior of brain mosaics in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **12**, 205-226.

Finley, K. D., Taylor, B. J., Milstein, M., and McKeown, M. (1997). *dissatisfaction*, a gene involved in sex-specific behavior and neural development of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 913-918.

Finley K. D., Edeen, P. T., Foss, M., Gross, E., Ghbeish, N., Palmer, R. H., Taylor, B. J., and McKeown, M. (1998). *dissatisfaction* encodes a tailless-like nuclear receptor expressed in subset of CNS neurons controlling *Drosophila* sexual behavior. *Neuron* **21**, 1363-1374.

Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* **332**, 853-856.

Fisher, J. M., Sossin, W., Newcomb, R., Scheller, R. H. (1988). Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell* **54**, 813-22.

FlyBase. (1999). The FlyBase database of the *Drosophila* Genome Projects and community literature. *Nucleic Acids Res.* **27**, 85-88.

Furuya, K., Harper, M. A., Schegg, K. M. and Schooley, D. A. (2000). Isolation and characterization of CRF-related diuretic hormones from the whitelined sphinx moth *Hyles lineata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 127-133.

Gäde, G. (1997). The explosion of structural information on insect neuropeptides. In: Herz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W., Tamm, C. (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, Wien. 1-128.

Gailey, D. A., Jackson, F. R., and Siegel, R. W. (1982). Male courtship in *Drosophila*: the conditioned response to immature males and its genetic control. *Genetics* **102**, 771-782.

Gailey, D. A., Jackson, F. R., and Siegel, R. W. (1984). Conditioning mutations in *Drosophila* affect an experience-dependent courtship modification in courting males. *Genetics* **106**, 613-623.

Gailey, D. A., Hall, J. C. (1989). Behavior and cytogenetics of fruitless in *Drosophila melanogaster*: different courtship defects caused by separate, closely linked lesions. *Genetics* **121**, 773-785.

Gailey, D. A., Taylor, B. J., and Hall, J. C. (1991). Elements of the *fruitless* locus regulate development of the muscle of Lawrence, a male-specific structure in the abdomen of *Drosophila melanogaster* adults. *Development* **113**, 879-890.

Garczynski, S. F., Brown, M. R., Shen, P., Murray, T. F., Crim, J. W. (2002). Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides* **23**, 773-780.

Gaumer, S., Guenal, I., Brun, S., Theodore, L., Mignotte, B. (2000). Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **7**, 804-814.

Gill, K. S. (1963). A mutation causing abnormal courtship and mating behavior in males of *Drosophila melanogaster*. *Am. Zool.* **3**, 507.

Goodwin, S. F., Taylor, B. J., Villella, A., Foss, M., Ryner L. C., Baker, B. S., and Hall, J.C. (2000). Molecular defects in the expression of the *fruitless* gene of *Drosophila melanogaster* caused by aberrant splicing in *P*-element insertional mutants. *Genetics* **154**, 725-745.

Greenspan, R. J., and Ferveur, J-F. (2000). Courtship in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.* **34**, 205-232.

Greenspan, R. J. (1995a). Flies, genes, learning and memory. *Neuron* **15**, 747-750.

Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K., Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev.* **9**, 1694-708.

Hall, J. C. (1986). Learning and rhythms in courting, mutant *Drosophila*. *Trends Neurosci.* **9**, 414-418.

Hall, J.C. (1994). The mating of a fly. *Science* **264**, 1702-1714.

Han, K. K., Belaiche, D., Moreau, O., Briand, G. (1985). Current developments in stepwise Edman degradation of peptides and proteins. *Int. J. Biochem.* **17**, 429-445.

Harlow, E., Lane, D. (1988). Antibodies - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 78-81.

Hassan, B. A., Bermingham, N. A., He, Y., Sun, Y., Jan, Y. N., Zoghbi, H. Y., Bellen, H. J. (2000). Atonal regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron* **25**, 549-561

Haugland, R. P. (1997). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA, 522-526.

Hayes, T. K., Pannabecker, T. L., Hinckley, D. J., Holman, G. M., Nachman, R. J., Petzel, D. H., Beyenbach, K. W. (1989). Leucokinins, a new family of ion transport stimulators and inhibitors in insect Malpighian tubules. *Life Sci.* **44**, 1259-1266.

Hazelrigg, T., Levis, R., Rubin, G. M. (1984). Transformation of white locus DNA in *Drosophila*: Dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell* **36**, 469-481.

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Keller, A., Stocker, R. F. (2001). A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **98**, 15336-15341.

Heisenberg, M., Heusipp, M., and Wanke, C. (1995). Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* **15**, 1951-1960.

Helfrich-Forster, C., Tauber, M., Park, J. H., Muhlig-Versen, M., Schneuwly, S., Hofbauer, A. (2000). Ectopic expression of the neuropeptide pigment-dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **20**, 3339-3353.

Herrero, P., Magarinos, M., Torroja, L., Canal, I. (2003). Neurosecretory identity conferred by the apterous gene: Lateral horn leucokinin neurons in *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* **457**, 123-132.

Hewes, R. S., Taghert, P. H. (2001). Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.* **11**, 1126-1142.

Hing, A. L., and Carlson, J. R. (1996). Male-male courtship behavior induced by ectopic expression of the *Drosophila white* gene: role of sensory function and age. *J. Neurobiol.* **30**, 454-464.

Holman, G. M., Cook, B. J. and Wagner, R. M. (1984). Isolation and partial characterization of five myotropic peptides present in head extracts of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Comp. Biochem. Physiol.* **77**, 1-5.

Holman, M., Nachman, R. J., Wright, M. S. (1990). A strategy for the isolation and structural characterization of certain insect myotropic peptides that modify the spontaneous contractions of the isolated cockroach hindgut. In *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*, édité par AR McCafferey et ID Wilson, Plenum Press, New York, NY, USA, 195-204.

Holman, G. M., Nachman, R. J., Coast, G. M. (1999). Isolation, characterization and biological activity of a diuretic myokinin neuropeptide from the housefly, *Musca domestica*. *Peptides* **20**, 1-10.

Holt, R. A. et al., (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129-149.

Horodyski, F. M., Riddiford, L.M., Truman, J.W. (1989). Isolation and expression of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 8123-8127.

Huynh, C. Q., Zieler, H. (1999). Construction of modular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. *J. Mol. Biol.* **288**, 13-20.

Huesmann, G. R., Cheung, C. C., Loi, P. K., Lee, T. D., Swiderek, K. M., Tublitz, N. J. (1995). Amino acid sequence of CAP2b, an insect cardioacceleratory peptide from the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* **371**, 311-314.

Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., Hetru, C. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15119-15124.

Ito, H., Fujitani, K., Usui, K., Shimizu-Nishikawa, K., Tanaka, S., Yamamoto, D. (1996). Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the *satori* mutation in the sex-determination gene *fruitless* that encodes a Zinc finger protein with a BTB domain. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9687-9692.

Jallon, J-M. (1984). A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. *Behav. Genet.* **14**, 441-478.

Janssen, I., Schoofs, L., Spittaels, K., Neven, H., Vanden Broeck, J., Devreese, B., Van Beeumen, J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., De Loof, A. (1996). Isolation of Neb-LFamide, a novel myotropic neuropeptide from the grey fleshfly. *Mol. Cell. Endocrinol.* **117**, 157-165.

Kataoka, H., Troetschler, R. G., Li, J. P., Kramer, S. J., Carney, R. L., and Schooley, D. A. (1989). Isolation and identification of a diuretic hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2976-2980.

Kean, L., Pollock, V. P., Broderick, K. E., Davies, S. A., Veenstra, J. A., Dow, J. A. T. (2002). Two new members of the CAP2b family of diuretic peptides are encoded by the gene *capability* in *Drosophila melanogaster*. *Am. J. Physiol.* **282**, 1297-1307.

Keeley, L. L., Hayes, T. K. (1987). Speculations on biotechnology applications for insect neuroendocrine research. *Insect. Biochem.* **17**, 639-651.

Keller, A., Sweeney, S. T., Zars, T., O'Kane, C. J., Heisenberg, M. (2002). Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioral responses to sensory input in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **50**, 221-233.

Kido, A., Ito, K. (2002). Mushroom bodies are not required for courtship behavior by normal and sexually mosaic *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **52**, 302-311.

Kingan, T. G. (1989). A competitive enzyme linked immunosorbent assay: Applications in the assay of peptides, steroids, and cyclic nucleotides. *Anal. Biochem.* **183**, 283-289.

Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature sensitive shibire allele in defined neurons. *J. Neurobiol.* **47**, 81-92.

Kitamoto, T. (2002). Conditional disruption of synaptic transmission induces male-male courtship behavior in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13232-13237.

Kolhekar, A. S., Roberts, M. S., Jiang, N., Johnson, R. C., Mains, R. E., Eipper, B. A., Taghert, P. H. (1997). Neuropeptide amidation in *Drosophila*: separate genes encode the two enzymes catalyzing amidation. *J. Neurosci.* **17**, 1363-1376.

Kollisch, G. V., Lorenz, M. W., Kellner, R., Verhaert, P. D., Hoffmann, K. H. (2000). Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5502-5508.

Kopec, S. (1922). Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull. Woods Hole* **42**, 322-342.

Kornberg, T. B., and Krasnow, M. A. (2000). The *Drosophila* genome sequence: implications for biology and medicine. *Science* **287**, 2218-2220.

Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**, 947-950.

Kubiak, T. M., Larsen, M. J., Burton, K. J., Bannow, C. A., Martin, R. A., Zantello, M. R. (2002). Lowery DE. Cloning and functional expression of the first *Drosophila melanogaster* sulfakinin receptor DSK-R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 313-320.

Kunes, S., Steller, H. (1991). Ablation of *Drosophila* photoreceptor cells by conditional expression of a toxin gene. *Genes Dev.* **5**, 970-983.

Lawrence, P. A., Johnston, P. (1986). The muscle pattern of a segment of *Drosophila* may be determined by neurons and not by contributing myoblasts. *Cell* **45**, 505-513.

Lee, T., Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.

Lee, G., and Hall, J. C. (2000). A newly uncovered phenotype associated with the fruitless gene of *Drosophila melanogaster*: aggression-like head interactions between mutant males. *Behav. Genet.* **30**, 263-275.

Lee, G., Foss, M., Goodwin, S. F., Carlo, T., Taylor, B. J., and Hall, J. C. (2000). Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the *fruitless* gene in the *Drosophila* central nervous system. *J. Neurobiol.* **43**, 404-426.

Lee, G., Vilella, A., Taylor, B. J., and Hall, J. C. (2001). New reproductive anomalies in *fruitless*-mutant *Drosophila* males: Extreme lengthening of mating durations and infertility correlated with defective serotonergic innervation of reproductive organs. *J. Neurobiol.* **47**, 121-149.

Maddrell, S. H. P. (1986). Hormonal control of diuresis in insects. Paru dans *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*, édité par AB Borkovec et DB Gelman, Humana Press, Clifton, NJ, USA, 79-90.

Markow, T. A. (1975). Effect of light on egg-laying rate and mating speed in phototactic strains of *Drosophila*. *Nature* **258**, 712-714.

McNabb, S. L., Baker, J. D., Agapite, J., Steller, H., Riddiford, L. M., Truman, J. W. (1997). Disruption of a behavioral sequence by targeted death of peptidergic neurons in *Drosophila*. *Neuron* **19**, 813-823.

McRobert, S. P., and Tompkins, L. (1988). Two consequences of homosexual courtship performed by *Drosophila melanogaster* and *Drosophila affinis* males. *Evolution* **42**, 1093-1097.

Meeusen, T., Mertens, I., Clynen, E., Baggerman, G., Nichols, R., Nachman, R. J., Huybrechts, R., De Loof, A., Schoofs, L. (2002). Identification in *Drosophila melanogaster* of the invertebrate G protein-coupled FMRFamide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15363-15368.

Mertens, I., Meeusen, T., Huybrechts, R., De Loof, A., Schoofs, L. (2002). Characterization of the short neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1140-1148.

Moffat, K. G., Gould, J. H., Smith, H. K., O'Kane, C. J. (1992). Inducible cell ablation in *Drosophila* by cold-sensitive ricin A chain. *Development* **114**, 681-687.

Mojsov, S., Heinrich, G., Wilson, I. B., Ravazzola, M., Orci, L., Habener, J. F. (1986). Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.* **261**, 11880-11889.

Moriyama, E. N., Powell, J.R. (1997). Codon usage bias and tRNA abundance in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **45**, 514-523.

Nässel, D. R. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog. Neurobiol.* **68**, 1-84.

Nässel, D. R., Lundquist, C. T. (1991) Insect tachykinin-like peptide: distribution of leucokinin immunoreactive neurons in the cockroach and blowfly brains. *Neurosci. Lett.* **130**, 225-228.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.

O'Dell, K. M. C., Armstrong, J. D., Yang, M. Y., and Kaiser, K. (1995). Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron* **15**, 55-61.

O'Donnell, M. J., Dow, J. A. T., Huesmann, G. R., Tublitz, N. J., Maddrell, S. H. P. (1996). Separate control of anion and cation transport in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **199**, 1163-1175.

O'Donnell, M. J., Rheault, M. R., Davies, S. A., Rosay, P., Harvey, B. J., Maddrell, S. H. P., Kaiser, K., Dow, J. A. T. (1998). Hormonally controlled chloride movement across *Drosophila* tubules is via ion channels in stellate cells. *Am. J. Physiol.* **274**, 1039-1049.

Panov, A. A. (1976). The composition of the medial neurosecretory cells of the *pars intercerebralis* in *Calliphora* and *Lucilia* adults. *Zoologischer Anzeiger, Jena.* **196**, 23-27.

Park, Y., Kim, Y. J., Adams, M. E. (2002). Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11423-11428.

Phillips, J. E., Audsley, N. (1995). Neuropeptide control of ion and fluid transport across locust hindgut. *Am. Zool.* **35**, 503-514.

Powell, J. R., Moriyama, E. N. (1997). Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7784-7790.

Proux, J., Rougon, G., Cupo, A. (1982). Enhancement of excretion across locust malpighian tubules by a diuretic vasopressin-like hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**, 449-57.

Proux, J. P., Miller, C. A., Li, J. P., Carney, R. L., Girardie, A., Delaage, M., Schooley, D. A. (1987). Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 180-186.

Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector - New fast and sensitive tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4878-4884.

Quinlan, M. C., Tublitz, N.J., O'Donnell, M. J. (1997). Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J. Exp. Biol.* **200**, 2363-2367.

Raabe, M. (1982). *Insect Neurohormone*. 352pp, Plenum press-New York.

Radford, J. C., Davies, S. A., Dow, J. A. T. (2002). Systematic G-protein-coupled receptor analysis in *Drosophila melanogaster* identifies a leucokinin receptor with novel roles. *J. Biol. Chem.* **277**, 38810-38817.

Reichwald, K., Unnithan, G. C., Davis, N. T., Agricola, H., Feyereisen, R. (1994). Expression of the allatostatin gene in endocrine cells of the cockroach midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11894-11898.

Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., Taghert, P. H. (1999). A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* **99**, 791-802.

Rholam, M., Brakch, N., Germain, D., Thomas, D. Y., Fahy, C., Boussetta, H., Boileau, G., Cohen, P. (1995). Role of amino acid sequences flanking dibasic cleavage sites in precursor proteolytic processing. The importance of the first residue C-terminal of the cleavage site. *Eur. J. Biochem.* **227**, 707-714.

Riehle, M. A., Garczynski, S. F., Crim, J. W., Hill, C. A., Brown, M. R. (2002). Neuropeptides and peptide hormones in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 172-175.

Robinow, S., White, K. (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J. Neurobiol.* **22**, 443-461.

Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 461-70.

Rosay, P., Davies, S. A., Yu, Y., Sözen, A., Kaiser, K., Dow, J. A. T. (1997). Cell-type specific calcium signalling in a *Drosophila* epithelium. *J. Cell. Sci.* **110**, 1683-1692.

Rosay, P., Armstrong, J. D., Kaiser, K. (1999). Targeted expression of aequorin, a novel approach to *Drosophila* neurophysiology. In: *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research* Edited by Crusio W, Gerlai R, vol. 13. pp. 487-495.

Ryner, L. C., Goodwin, S. F., Castrillon, D. H., Anand, A., Vilella, A., Baker, B. S., Hall, J. C., Taylor, B. J., and Wasserman, S. A. (1996). Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell* **87**, 1079-1089.

Sanger, F., Thompson, E. O. P., Kitai, R. (1955). *Biochem. J.* **59**, 509.

Schaefer, M., Picciotto, M. R., Kreiner, T., Kaldany, R. R., Taussig, R., Scheller, R. H. (1985). *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neuropeptides. *Cell* **41**, 457-467.

Scharrer, B. (1978). Peptidergic neurons : facts and trends. *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**, 50-62.

Schneider, L. E., Taghert, P. H. (1988). Isolation and characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1993-1997.

Sciandra, R. J. Jr., Bennett, J. (1976). Behavior and single gene substitution in *Drosophila melanogaster*. I. Mating and courtship differences with *w*, *cn*, and *bw* loci. *Behav. Genet.* **6**, 205-18.

Sharma, R. P. (1977). Light-dependant homosexual activity in males of a mutant of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **33**, 171-173.

Siegel, R. W., and Hall, J. C. (1979). Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 3430-3434.

Starrat, A. N., Brown, B. E. (1975). Structure of the pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.* **17**, 1253-1256.

Sözen, M. A., Armstrong, J. D., Yang, M., Kaiser, K., Dow, J. A. T. (1997). Functional domains are specified to single-cell resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5207-5212.

Spradling, A.C., Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-347.

Stocker, R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: *Cell Tissue Res.* **275**, 3-26.

Stone, J. V., Mordue, W., Betley, K. E., Morris, H. R. (1976). Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature* **265**, 207-221.

Swaab, D. F., Hofman, M. A. (1990). An enlarged suprachiasmatic nucleus in homosexual men. *Brain Res.* **537**, 141-148.

Tager, H. S. (1976). Coupling of peptides to albumin with difluorodinitrobenzene. *Anal. Biochem.* **71**, 367-375.

Taghert, P. H., Veenstra, J. A. (2003). Neuropeptide signalling in *Drosophila*. *Adv. Gen.* sous presse.

Taghert, P. H., Hewes, R. S., Park, J. H., O'Brien, M. A., Han, M., Peck, M.E. (2001). Multiple amidated neuropeptides are required for normal circadian locomotor rhythms in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **21**, 6673-86.

Taghert, P. H., Schneider, L. E. (1990). Interspecific comparison of a *Drosophila* gene encoding FMRFamide-related neuropeptides. *J. Neurosci.* **10**, 1929-1942.

Te Brugge, V. A., Nässel, D. R., Coast, G. M., Schooley, D. A., Orchard, I. (2001). The distribution of a kinin-like peptide and its co-localization with a CRF-like peptide in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Peptides* **22**, 161-73.

Terhzaz, S., O'Connell, F. C., Pollock, V. P., Kean, L., Davies, S. A., Veenstra, J. A., Dow, J. A. T. (1999). Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **202**, 3667-3676.

Thummel, C. S., Boulet, A. M., Lipshitz, H. D. (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445-56.

Tompkins, L. (1984). Genetic analysis of sex appeal in *Drosophila*. *Behav. Genet.* **14**, 411-440.

Thompson, K. S., Rayne, R. C., Gibbon, C. R., May, S. T., Patel, M., Coast, G. M. and Bacon, J. P. (1995). Cellular colocalization of diuretic peptides in locusts: a potent control mechanism. *Peptides* **16**,95-104.

Torfs, P., Nieto, J., Veelaert, D., Boon, D., van de Water, G., Waelkens, E., Derua, R., Calderon, J., de Loof, A., Schoofs, L. (1999). The kinin peptide family in invertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **897**, 361-373.

Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I., White, K. (1999). Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr. Biol.* **9**, 489-92.

Truman, J. W. (1990). Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **22**, 1072-1184.

Vanden Broeck, J. (2001a). Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides* **22**, 241-254.

Veenstra, J. A. (1994). Isolation and identification of three leucokinins from the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **202**, 715-719.

Veenstra, J. A., Pattillo, J. M., Petzel, D. H. (1997). A single cDNA encodes all three *Aedes* leucokinins, which stimulate both fluid secretion by the Malpighian tubules and hindgut contractions. *J. Biol. Chem.* **272**, 10402-10407.

Veenstra, J. A. (1994). Isolation and structure of the *Drosophila* corazonin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 292-296.

Veenstra, J. A. (2000). Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **43**, 49-63.

Veenstra, J. A., Romberg-Privee, H. M., Schooneveld, H. (1984). Immunocytochemical localization of peptidergic cells in the neuro-endocrine system of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, with antisera against vasopressin, vasotocin and oxytocin. *Histochemistry* **81**, 29-34.

Veenstra, J. A. (1988). Immunocytochemical demonstration of vertebrate peptides in invertebrates: the homology concept. *Neuropeptides* **12**, 49-54.

Veenstra, J. A., Yanaihara, N. (1984). Immunocytochemical localization of gastrin-releasing peptide/bombesin-like immunoreactive neurons in insects. *Histochemistry* **81**, 133-138.

Villella, A., Gailey, D. A., Berwald, B., Ohshima, S., Barnes, P. T., and Hall, J. C. (1997). Extended reproductive role of the *fruitless* gene in *Drosophila melanogaster* revealed by behavioral analysis of new *fru* mutants. *Genetics* **147**, 1107-1130.

Von Heijne, G., Abrahmsen, L. (1989). Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**, 439-446.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K., Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-683.

White, K., Tahaoglu, E., Steller, H. (1996). Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science* **271**, 805-807.

White, K. P., Rifkin, S. A., Hurban, P., Hogness, D. S. (1999). Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science* **286**, 2179-2184.

Wigglesworth, V. B. (1972). The principles of insect physiology. 7e édition, 827pp. Chapman and Hall, London.

Yamamoto, D., Fujitani, K., Usui, K., Ito, H., Nakano, Y. (1998). From behavior to development: genes for sexual behavior define the neuronal sexual switch in *Drosophila*. *Mech. Devel.* **73**, 135-146.

Yamamoto, D., Nakano, Y. (1999). Sexual behavior mutant revisited : molecular and cellular basis of *Drosophila* mating. *Cell. Mol. Life. Sci* **56**, 634-646.

Yao, K. M., White, K. (1994). Neural specificity of *elav* expression: defining a *Drosophila* promoter for directing expression to the nervous system. *J. Neurochem.* **63**, 41-51.

Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J., Kastin, A. J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* **386**, 499-502.

Zars, T. (2000). Behavioral functions of insect mushroom bodies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 790-795.

Zhang, S. D., and Odenwald, W. F. (1995). Misexpression of the *white (w)* gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5525-5529.

Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H., Nambu, J. R. (1997) Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5131-5136.

Zusman, S. B., Wieschaus, E.F. (1985). Requirements for zygotic gene activity during gastrulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **111**, 359-371.

LISTE DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

(1)- **Terhzaz, S.**, O'Connell, F. C., Pollock, V. P., Kean, L., Davies, S. A., Veenstra, J. A., Dow, J. A. T. (1999). Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **202**, 3667-3676.

(2)- **Terhzaz, S.**, Veenstra, J. A. (2003). Expression of an artificial neuropeptide precursor in *Drosophila melanogaster*. En préparation.

(3)- **Terhzaz, S.**, Rosay, P., Veenstra, J. A. (2003). Defining the role of *Drosophila* IFamide neurons in the male sexual behavior by targeted genetic ablation. En préparation.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

(1)- **Terhzaz, S.**, O'Connell, F. C., Pollock, V. P., Davies, S. A., Veenstra, J. A., Dow, J. A. T. (1998). Identification of a *Drosophila* leucokinin. 19th Conference of European Comparative Endocrinologists, Sept 1-5, Nijmegen (Netherlands).

(2)- **Terhzaz, S.** (1999). Identification d'une neurohormone diurétique chez *Drosophila melanogaster*. 8^{ième} Colloque de la formation Doctorale de Neurosciences et Neuropharmacologie. Arcachon.

(3)- **Terhzaz, S.** (2000). Identification d'un neuropeptide chez *Drosophila melanogaster* : L'IFamide. 9^{ième} Colloque de la formation Doctorale de Neurosciences et Neuropharmacologie. Arcachon.

(4)- **Terhzaz, S.** (2000). Le neuropeptide IFamide. 15^{ième} Colloque des Drosophilistes de France. Cannes.

(5)- **Terhzaz, S.**, Rosay, P., Veenstra, J. A. (2002). Bisexual behavior in male drosophila lacking four peptidergic neurons. 9th European Symposium on *Drosophila* Neurobiology, Sept 7-11, Dijon.

COMMUNICATIONS ORALES

(1)- **Terhzaz, S.** (1998). Identification of a *Drosophila* leucokinin. IBLS Division of Molecular Genetics, University of Glasgow, UK.

(2)- **Terhzaz, S.** (2002). Identification and characterization of a *Drosophila* neuropeptide: IFamide. IBLS Division of Molecular Genetics, University of Glasgow, UK.

Nous avons isolé et identifié deux neuropeptides de la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, la leucokinine et l'IFamide. La leucokinine, NSVVLGKKQRFHSWGamide, agit comme une hormone diurétique à une concentration seuil de 0,1 nM en utilisant le calcium comme second messenger. L'IFamide, AYRKPPFNGSIFamide, est produit par quatre cellules dans le cerveau et nous avons démontré que des mâles dépourvus de ces quatre neurones sont bisexuels. Nous avons construit un gène artificiel codant un précurseur contenant plusieurs copies de neuropeptides et créé des mouches qui surexpriment ces neuropeptides artificiels.

MOTS-CLES : *Drosophila melanogaster*, Leucokinine, IFamide, physiologie rénale, comportement sexuel, gène artificiel, précurseur de neuropeptide.

We have isolated and identified two neuropeptides from the fruitfly, *Drosophila melanogaster*, leucokinin and IFamide. *Drosophila* leucokinin, NSVVLGKKQRFHSWGamide, acts as a diuretic hormone with a threshold concentration of 0,1 nM and uses calcium as a second messenger. IFamide, AYRKPPFNGSIFamide, is produced by four neurons in the brain and males lacking these four peptidergic neurons are bisexuals. We have constructed an artificial precursor gene encoding several copies of neuropeptides and have made flies that over express the artificial neuropeptide gene.

KEY-WORDS: *Drosophila melanogaster*, Leucokinin, IFamide, renal physiology, courtship behaviour, artificial gene, neuropeptide precursor.