THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

SPÉCIALITÉ BIOLOGIE - ÉCOLE DOCTORALE LOGIQUE DU VIVANT Présentée par Virginie Orgogozo Pour obtenir le grade de docteur de l'université Paris 6

Formation des organes sensoriels chez *D. melanogaster* : lignages cellulaires, apoptose et évolution

Thèse dirigée par François Schweisguth soutenue le vendredi 27 juin 2003

devant le jury composé de :	
Yohanns Bellaïche	co-directeur de thèse
Jean Deutsch	président du jury
Marie-Anne Felix	examinateur
François Schweisguth	co-directeur de thèse
Patricia Simpson	rapporteur
Michel Vervoort	rapporteur

À mes parents

À Fabrice

Everything in biology makes more sense in the light of evolution.

Remerciements

Tout d'abord un immense merci à Yohanns et François pour les très beaux sujets de thèse qu'ils m'ont laissé aborder et grâce à qui j'ai tant appris au cours de ces quatre années. Yohanns, je garderai un excellent souvenir de nos allées et venues au microscope confocal de Jussieu. Cela a été un grand plaisir de travailler avec toi et de prendre conscience qu'on peut toujours en demander plus aux protocoles expérimentaux pour les améliorer ou les modifier, et surtout, que tout ce qui est connu est bon à prendre pour expliquer ce que l'on observe. François, merci pour tes excellents conseils et tes idées qui ont toujours l'air d'être extrêmement claires dans ta tête, contrairement aux miennes. J'espère pouvoir te ressembler au moins un petit peu plus tard dans ma vie de chercheur.

Merci également aux autres membres du laboratoire Roland, Olivia, Allison, David, Isabella et Véronique pour tous les moments que nous avons vécus, notamment les réunions de labo que je ne voudrais jamais manquer mais qui vont beaucoup me manquer l'année prochaine, et aussi tous les pots et autres fêtes.

Merci à tous les membres du département de biologie de l'E.N.S. pour leur aide dans tous les domaines au cours de ma thèse (réponses à mes questions, discussions, exposés, traductions, pots, études statistiques, problèmes informatiques, documents administratifs, etc).

Merci à Marie-Anne Felix, Pat Simpson, John True, David Stern, Claude Desplan, Nipam Patel, Sean Carroll et Markus Noll pour leur accueil très chaleureux. Je garde un excellent souvenir de ma visite dans leurs laboratoires respectifs et espère de tout cœur avoir l'occasion d'y retourner bientôt.

Merci au personnel des bibliothèques de Jussieu-recherche et du Muséum d'Histoire Naturelle pour leur gentillesse et leurs efforts constants pour retrouver et conserver de vieux ouvrages très précieux.

Merci à Pat Simpson, Michel Vervoort et Marie-Anne Felix d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Tout particulièrement, merci Pat pour votre extrême gentillesse, vos conseils et votre soutien qui me touchent beaucoup.

Merci aussi à tous ceux qui m'ont beaucoup apporté au fil de discussions ou de lectures, notamment Michel Gho, Pierre Fichelson, Alfonso Martinez-Arias, Andrea Brand, Sébastien Maugenest, Thomas Tully, Eric Lai, Nipam Patel, Jean Deutsch, Markus Noll, Werner Boll, David Stern, Wesley Grueber, Claude Desplan, Angela Giangrande, Alain Vincent, Véronique Brodu, Andrew Jarman, Michael Manuel, Paul Taghert, Daniel Lachaise, Pedro Santamaria, Nicolas Gompel... et tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

Et surtout, merci à Fabrice, qui a participé au moins autant que moi à toute cette thèse.

Sommaire

INTRODUCTION

Comment les cellules produites au cours du développement deviennent-elle différentes les unes des autres!? La formation des organes sensoriels de <i>D. melanogaster</i> comme modèle d'étude	s 6
La formation des organes sensoriels chez les Insectes, un très vieux modèle d'étuc	<i>le</i> 8
La diversité des organes sensoriels de D. melanogaster	_11
La formation des organes sensoriels chez D. melanogaster	_14
Conférer une compétence neurale à un groupe de cellules : les gènes proneuraux Cinq gènes proneuraux : achaete, scute, lethal of scute, atonal et amos	_ 16 _ 16
Un gène proneural, différents types d'organes sensoriels formés	18
D'autres gènes proneuraux non identifiés chez D. melanogaster ?	19
Les gènes proneuraux confèrent-ils une identité sensorielle ?	_ 20
Lethal of scute a probablement perdu son rôle proneural sensoriel au cours de l'évolution	_ 22
La formation de certains organes chordotonaux ne dépend pas d'atonal	_ 24
Les gènes proneuraux chez les autres animaux	_ 24
Restreindre la compétence neurale à une seule cellule : Notch et l'inhibition latérale	25
La voie de signalisation noton	20
L'infibilion laterale : choix aleatoire de la cendre precuiseur	20
Modification du modèle: le choix n'est pas aléatoire pour les neuroblastes et les macrochètes	28
Les cellules du groupe proneural pourraient inhiber leurs voisines à grande distance	30
Produire des organes sensoriels différents	30
Organe sensoriel externe ou interne!? les gènes <i>atonal</i> et <i>cut</i>	31
Mono-innervé mécanosensoriel ou poly-innervé gustatif!? Le gène <i>pox-neuro</i>	33
Produire des cellules différentes : les divisions asvmétriques	35
XXème siècle : différents lignages pour divers organes sensoriels	35
Donner deux cellules filles différentes : à nouveau la voie Notch	38
Numb inhibe la voie de signalisation Notch	39
Un autre modulateur de la voie Notch!: Neuralized	40
Prospero!: un autre déterminant d'identité cellulaire!?	41
La machinerie de localisation asymétrique des déterminants au cours de la division du	
neuroblaste	_ 42
La division de pIIb ressemble à celle du neuroblaste	45
La division de pll: un équilibre entre deux complexes antérieur et postérieur	45
L'orientation de la division de plla est déterminée par celle de pl	_ 46
Chez D. melanogaster, de nombreux autres tissus sont formés grâce au même mod	le
de développement	_46
Conclusion mas preists at résultate	E 4
Droiot 11: lo lignage des organes sonsoriels externes de l'ambruen	_31 51

Projet 19. le lighage des organes sensonels externes de l'emplyon	51
Projet 21: apoptose dans les lignages sensoriels	52
Projet 31: migration des cellules sensorielles	53
Projet 4!: un seul lignage canonique pour divers organes sensoriels	53
Projet 5!: apoptose dans les lignages et évolution du patron du SNP	53

ARTICLE 1	
Lineage, cell polarity and <i>Inscuteable</i> function in the peripheral nervous system of the Drosophila embryo	55
ARTICLE 2	
Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at m	itosis
	70
ARTICLE 3	
Slit-Robo signalling prevents sensory cells from crossing the midline in Drosophila	79
ARTICLE 4	
A hidden program in <i>Drosophila</i> peripheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity	97
PARTIE 5	
Evolution du patron des organes sensoriels chez les larves de Muscomor	phes
	_ 126
	_ 139
ANNEXE	_ 147
Les organes sensoriels de la larve	
Les organes sensoriels de l'adulte	
Protocoles	
RÉFÉRENCES	165

Abréviations utilisées

- SNC système nerveux central
- SNP système nerveux périphérique
- pI cellule précurseur primaire

INTRODUCTION

Comment les cellules produites au cours du développement deviennent-elles différentes les unes des autres ?

La formation des organes sensoriels de *D. melanogaster* comme modèle d'étude

Le développement des organismes pluricellulaires à partir d'une cellule unique est un phénomène fascinant et pourtant tout à fait commun aujourd'hui sur notre planète. Ce processus extraordinaire soulève de nombreuses questions. Comment les cellules produites par une seule cellule deviennent-elles différentes les unes des autres ? À quelle étape du développement les cellules acquièrent-elles différentes identités ? Comment s'organisent-elles en structures pluricellulaires ? Comment, à partir d'un matériel génétique unique contenu dans la cellule progénitrice, sont mis en place les différentes programmes de différenciation cellulaire ?

Au cours de ma thèse, j'ai tenté d'apporter quelques éléments de réponse à ces questions fondamentales de la biologie du développement en étudiant la formation de certains organes sensoriels pluricellulaires chez Drosophila melanogaster. Les études du développement réalisées jusqu'à présent indiquent qu'il existe deux principaux modes de diversification cellulaire. Dans le premier cas, des divisions cellulaires donnent des cellules identiques qui acquièrent par la suite des destinées distinctes. Dans le deuxième cas, l'établissement d'une différence entre deux cellules a lieu au cours de la division cellulaire qui va les engendrer. Ces divisions cellulaires sont appelées divisions asymétriques. La formation des organes sensoriels de D. melanogaster combine ces deux modes de diversification cellulaire. L'un des résultats les plus surprenants obtenus au cours de ces vingt dernières années de recherche en biologie du développement est que les mécanismes qui contrôlent le développement d'un tissu donné chez un organisme (comme les cellules sensorielles chez D. melanogaster) sont également utilisés de façon similaire pour former d'autres tissus chez ce même organisme ou chez d'autres espèces. Comprendre comment les cellules sensorielles de D. melanogaster se forment au cours du développement permet donc d'apporter des réponses potentiellement généralisables à au moins une grande partie des êtres pluricellulaires.

La formation des organes sensoriels chez les Insectes, un très vieux modèle d'étude

De par leurs formes les plus variées et leurs fonctions plus ou moins mystérieuses, les organes sensoriels des Insectes fascinent les biologistes depuis plus d'un siècle (références 1). Le traité de Berlese sur les Insectes publié en 1909, par exemple, met en évidence l'incroyable diversité morphologique et cellulaire de ces organes, que ce soit entre espèces différentes ou au sein de la même espèce. Les premières études de ces organes ont consisté à décrire le nombre et la morphologie des différentes cellules qui composent un organe sensoriel. Un nombre variable de cellules a été observé, avec toujours une ou plusieurs cellules possédant

un dendrite supposé sensoriel ainsi que plusieurs cellules accessoires distinctes. Ces cellules très spécialisées, situées dans l'épithélium ou juste en dessous, ont toujours été considérées comme produites à partir de l'épithélium lui-même. Cependant, une controverse a subsisté jusque vers les années 50 à propos de l'origine du neurone sensoriel qui transmet l'information sensorielle, de la périphérie jusqu'au système nerveux central. Un axone allant de la cellule dendritique périphérique au système nerveux central avait été observé, suggérant que la cellule dendritique était effectivement le neurone lui-même. Mais certains auteurs refusaient de croire que le neurone dérive de l'épiderme et avancaient l'idée que l'axone avait migré vers la périphérie à partir du corps cellulaire d'un neurone résidant dans le système nerveux central, et qu'il avait fusionné avec la cellule épithéliale dendritique. (À ce momentlà, la théorie cellulaire de Théodore Schwann et Jacob Schleiden, établie en 1830, et la théorie neuronale de Ramon y Cajal de 1873 étaient communément acceptées pour tous les tissus sauf pour quelques régions du système nerveux, qui semblaient former, avec les techniques de microscopie de l'époque, un syncytium de neurones (Hilton, 1902).) Les observations réalisées dans le même temps et dans les années 50 ont montré définitivement que l'axone est produit par la cellule sensorielle dendritique. Le neurone de l'organe est donc bien la cellule sensorielle dendritique et il provient de l'épiderme.

Les premières études détaillées de la formation de chacune des cellules d'un organe épidermique au cours du développement ont porté sur les écailles qui recouvrent les ailes des papillons. Ces écailles sont composées de deux cellules épidermiques: une cellule de l'écaille et une cellule socle qui entoure la précédente. Ces vieux travaux très minutieux indiquent que les deux cellules sont formées par division cellulaire d'une seule cellule précurseur, visible au sein de l'épithélium car elle est plus grosse que les cellules épithéliales avoisinantes. De façon reproductible, cette cellule précurseur se divise deux fois de suite. La première division donne une petite cellule qui dégénère et disparaît ainsi qu'une grosse cellule qui se divise à nouveau pour donner les deux cellules de l'écaille (Stossberg, 1938; Fig. 1). Très influencés par cette description extrêmement précise, plusieurs auteurs se lancent alors dans l'observation de la formation des organes sensoriels des Insectes dans les années 50. À chaque fois, une grosse cellule est observée avant l'apparition de toutes les cellules de l'organe, suggérant que les cellules d'un organe dérivent toujours d'une seule cellule précurseur (résumé dans Bate, 1978). Cependant, en dépit des recherches de similitudes entre lignages sensoriels, aucun point commun n'est mis en évidence: le nombre et l'orientation des divisions successives de la cellule précurseur semblent être extrêmement variables selon les organes et les espèces (Peters, 1963; Lawrence, 1966). De façon inattendue, les travaux effectués ces cinq dernières années sur les organes sensoriels de D. melanogaster, dont mon travail de thèse, mettent en évidence une très grande conservation dans la séquence des divisions cellulaires successives réalisées par la cellule précurseur. Ces résultats apportent un regard nouveau sur la formation des organes sensoriels chez les Insectes.



Fig. 1 - Première description détaillée du lignage d'un organe épidermique chez les Insectes. (A-B) Les écailles qui recouvrent les ailes des papillons sont consitués de deux parties, l'écaille elle-même et son socle, produites par deux cellules différentes. (C) Dessins réalisés par Margarete Stossberg en 1938 du lignage des écailles chez *Ephestia kühniella* (Stossberg, 1938).

Le neurone sensoriel est issu du SNC Berlese, 1909 Haffer, 1921, Arch. Naturgesch. 87, Abt A, 110-166 Vogel, 1923 Franzl, 1941 Snodgrass, 1929 (revue) Bate, 1978 (revue)

Le neurone sensoriel est issu de l'épiderme Vom Rath, 1888

Henke and Rönsch, 1951 Krumins, 1952

L'axone croît de l'épiderme vers le SNC

Sanchez, 1919a Sanchez, 1919b Sorokina-Agafonowa, 1924 Newton, 1931 Henke and Rönsch, 1951 Krumins, 1952 Nüesch, 1952

Description du lignage des écailles non innervées des Lépidoptères Von Schuckmann, 1909 Semper, 1857 Schäffer, 1889 Mayer, 1896 Köhler, 1932 Stossberg, 1937 Stossberg, 1938 Süffert, 1937 Henke and Rönsch, 1951 Henke and Pohley, 1952, Z. Naturforschg 7b, 65-79 Lipp, 1957 (Galant et al., 1998)

Description du lignage d'organes épidermiques non innervés Henke and Rönsch, 1951: Flügelhaaren and Flügelborsten in *Limnophilus* Stabenau, 1952, Nachr Akad Wiss Göttingen, Math Phys Klasse 7-14: glande épidermique Wigglesworth, 1953: glande épidermique Rönsch, 1954: hairs in *Limnophilus* Richter, 1962: scales in *Lepisma* Lawrence, 1966: hairs in Oncopeltus

```
Premières descriptions du lignage d'organes sensoriels
Henke and Rönsch, 1951: Sinnesorgan mit vier Sinneszellen in Limnophilus
Krumins, 1952: bristle in Galleria mellonella (travail influencé par les travaux sur
les écailles des papillons)
Lipp, 1953, Chromosoma 5, 454-486
Wigglesworth, 1953: sensory hairs in Rhodnius prolixus
Rönsch, 1954: ajout d'une division supplémentaire dans le modèle précédent, pour
expliquer la formation de la nouvelle cellule décrite à côté du neurone
Clever, 1958: écailles innervées, soies mécanosensorielles et chémosensorielles de
??la
Clever, 1960: soies mécanosensorielles et chémosensorielles de Galleria mellonella
Lukoschus, 1962 (organe chordotonal) Z. Bienenforsch 6, 48-52
Peters, 1963: soies chémosensorielles du labelle de Calliphora erythrocephala et
bonne revue
Lawrence, 1966: soies mécanosensorielles et chémosensorielles de Oncopeltus fasciatus
et bonne review
Jägers-Röhr, 1968: organe chordotonal
Ball and Young, 1974, Z Zellforsch 147, 313
Bate, 1978 (revue)
```

Références 1 – Description de la formation d'organes épidermiques chez les Insectes avant 1980

La diversité des organes sensoriels de *D. melanogaster*

La première description détaillée des organes sensoriels de la larve et de l'adulte chez *D. melanogaster* remonte à 1931 (Hertweck, 1931). Si on exclut les organes photorécepteurs, on peut distinguer chez *D. melanogaster* comme chez les autres Insectes trois types d'organes sensoriels selon leur morphologie (Fig. 2):

- * les **organes sensoriels externes**. Une partie de l'organe sensoriel est visible à la surface de l'animal, comme leur nom l'indique,
- * les organes sensoriels internes ou organes chordotonaux, sans structure cuticulaire visible, situés sous la cuticule,
- * les neurones multidendritiques, situés sous la cuticule.

Le dernier type est constitué d'une seule cellule (le neurone), alors que les deux premiers types comprennent plusieurs cellules accessoires associées à un ou plusieurs neurone. Les neurones innervant les organes externes et internes possèdent un unique dendrite, à l'intérieur duquel se trouve un cil modifié, qui s'insère dans les cellules accessoires de l'organe. Ces neurones sont appelés **neurones de type I** alors que les neurones multidendritiques, qui ne sont pas ciliés et présentent plusieurs dendrites sont **de type II.** (La nomenclature « neurone de type I/II » a été introduite par Alexus Zawarzin en 1912 lors de son étude de larves de libellules du genre *Aeschna*. Elle est utilisée par tous les drosophilistes depuis la mise en évidence des neurones de type II chez *D. melanogaster* par Rolf Bodmer et Yuh Nung Jan en 1987. Notons que pour les autres Insectes et les Crustacés, d'autres nomenclatures sont également utilisées.)

Chaque type présente une très grande diversité de formes. Par exemple, les organes externes peuvent former des soies de toute les tailles (soies trichoïdes, les plus grosses étant appelées macrochètes et les plus petites microchètes), des soies épaisses, pointues, fines, recourbées, bifides, des petits domes ou papilles (soies campaniformes), des petites chevilles (soies basiconiques)...

La fonction de ces différents organes chez D. melanogaster n'a pas été étudiée en général. Elle a été extrapolée à partir des études réalisées sur des Insectes plus gros qui ont des organes sensoriels morphologiquement semblables. Ainsi, toutes les soies (organes externes) qui n'ont pas de pores à leur surface sont supposées être mécanosensorielles. La déflection de la soie déforme le dendrite sensoriel et entraîne l'ouverture de canaux mécanosensoriels qui génèrent un flux d'ions K+ dans le neurone (Keil, 1997 ; Walker et al., 2000). Tous les organes mécanorécepteurs, chez D. melanogaster et chez la plupart des Insectes, sont innervés par un seul neurone. Ils sont constitués de quatre cellules différentes : le neurone, une cellule gaine qui enveloppe le neurone, une cellule soie qui produit la soie et une cellule socle qui produit le socle cuticulaire à la base de la soie. D'autres types de soies présentent un seul pore à leur extrémité distale et sont localisées seulement dans certains endroits du corps, dont le labelle, les ailes, les antennes et les pattes. Des expériences électrophysiologiques réalisées chez D. melanogaster ont montré que ces organes comprennent en général cinq neurones de modalités différentes. L'un est mécanosensoriel et les quatre autres sont chémosensoriels: l'un répond à l'eau, l'un au sucre dissout dans l'eau et les deux autres aux sels (résumé dans Singh, 1997). Ces organes sont donc considérés comme



Fig. 2 - Les différents types d'organes sensoriels de *D. melanogaster*. (A) Partie cuticulaire des organes externes. (B) Dilatations dendritiques des organes internes vus au microscope Nomarski, (C) Neurones multidendritiques. (D) Schéma d'une scolopidie innervée par deux neurones. (E) Schémas de quatre organes sensoriels externes différents. De gauche à droite : soie mécanosensorielle, soie campaniforme, soie gustative, soie olfactive. Seuls les neurones sont représentés. Les dendrites des neurones mécanosensoriels ont tous un corps tubulaire (TB) à leur extrémité distale. Sc: scolopale. D'après Schmidt et Gnatzy, 1984.

gustatifs, par opposition aux organes olfactifs qui sont sensibles à des substances volatiles présentes dans l'air. Les organes olfactifs de *D. melanogaster* sont, chez l'adulte, situés exclusivement sur le troisième segment antennaire et le palpe maxillaire. Sur toute la surface des soies olfactives sont observés de nombreux pores. Il existe différent types morphologiques et physiologiques de soies olfactives (Stocker, 1994). Les organes externes en forme de papille (sans pores) seraient des mécanorécepteurs sensibles au cisaillement de la cuticule (Altner, 1977) et ceux en forme de cheville (sans pores également) pourraient être des hygrorécepteurs d'après les études menées chez le criquet (Altner et al., 1981).

Les organes chordotonaux sont le plus souvent constitués de plusieurs unités sensorielles appelées **scolopidies** qui ont une forme allongée. Certains sont attachés à leurs deux extrémités à la cuticule et seraient sensibles à l'étirement de la cuticule. D'autres sont attachés à une membrane rigide, le tympan, et ont une fonction auditive (Caldwell et Eberl, 2002).

La fonction des neurones multidendritiques est celle qui est la moins connue. Certains neurones multidendritiques émettent des prolongements autour des muscles ou des trachées et répondraient à une déformation musculaire ou trachéale (Bodmer et Jan, 1987). D'autres forment un réseau plus ou moins dense de dendrites au sein de l'épithélium (Grueber et al., 2002). D'après leur morphologie chez la mouche *Phormia*, il a été proposé que ces neurones sont sensibles à la tension de la cuticule (Osborne, 1963). Plusieurs expériences récentes indiquent que certains neurones multidendritiques de l'embryon de D. melanogaster seraient sensibles à la température. Premièrement, la visualisation de la concentration intracellulaire de calcium avec une GFP dont la fluorescence varie avec la concentration de calcium indique que certains neurones multidendritiques répondent à des variations de température (Liu et al., 2003). Deuxièmement, quand les neurones multidendritiques sont détruits (par expression d'un gène codant la toxine tétanique sous le contrôle d'un promoteur Gal4 relativement spécifique des neurones multidendritiques), les larves ne répondent plus à une augmentation nocive de la température (Tracey et al., 2003). Troisièmement, les neurones multidendritiques expriment le gène painless, qui code un canal ionique de la famille TRP (transient receptor potential ion channel) et qui est requis pour la sensibilité aux températures nocives et aux chocs mécaniques (Tracey et al., 2003). D'autres neurones multidendritiques sont beaucoup plus profonds et ne semblent pas en contact avec la cuticule. Ils seraient peut-être neurosécréteurs (Paul Taghert, communication personnelle). Il semble donc que le terme neurone multidendritique ou neurone de type II regroupe en fait des neurones aux fonctions sensorielles - ou peut-être même non sensorielles - très variées.

Les organes sensoriels de *D. melanogaster* sont situées à des positions très reproductibles d'un individu à l'autre. Par exemple, les segments abdominaux de la larve présentent un nombre constant de cellules sensorielles qui ont exactement la même position d'un individu à l'autre (voir annexe). Le nombre de soies peut toutefois varier légèrement dans certaines régions du corps, comme au niveau des rangées de microchètes sur le thorax (Simpson et al., 1999) ou des petites soies mécanosensorielles des palpes maxillaires (observations personnelles). La liste des organes sensoriels de *D. melanogaster* chez la larve et chez l'adulte est en annexe.

La formation des organes sensoriels chez D. melanogaster

Les cellules des organes sensoriels de la larve sont toutes produites au cours de l'embryogenèse alors que les cellules sensorielles de l'adulte sont soit des cellules formées à partir des disques imaginaux au cours de la métamorphose, soit des cellules sensorielles de la larve qui ne sont pas mortes au cours de la métamorphose.

Les premières études génétiques des organes sensoriels chez *D. melanogaster* se sont concentrées sur la croissance de la soie et du socle, qui sont les deux structures cuticulaires caractéristiques des organes externes produites respectivement par les cellules soie et socle (Lees et Waddington, 1942). Puis les travaux ont principalement porté sur les facteurs qui contrôlent la position (Stern, 1954) et l'absence/présence des soies (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Garcia-Bellido, 1979).

En 1989, à partir des données obtenues grâce à plusieurs mutants affectant le SNP, Christine Dambly-Chaudière et Alain Ghysen ont proposé un modèle de développement des organes sensoriels, constitué d'une série d'étapes successives au cours desquelles les cellules acquièrent des identités de plus en plus précises (Ghysen et Dambly-Chaudière, 1989, Fig. 3). Dans une première étape, un groupe de cellules au sein de l'épithélium monostratifié de l'embryon ou des disques imaginaux (appelé groupe proneural) se met à exprimer un gène proneural. Ce gène confère au groupe de cellules qui l'exprime la capacité de se différencier en cellule précurseur (soit d'un organe sensoriel, soit de cellules nerveuses et gliales du SNC). La position du groupe proneural au sein de l'épithélium est déterminée par des gènes dits de pré-pattern. Dans une deuxième étape, les interactions cellulaires au sein du groupe proneural restreignent la capacité à former une cellule précurseur à une cellule du groupe proneural. Cette cellule devient la cellule précurseur primaire (pI) de l'organe. Dans une troisième étape, les cellules pI ainsi spécifiées empêchent leurs voisines de devenir également des cellules pI. Ce phénomène est appelé inhibition latérale. Ensuite, les cellules pI suivent une séquence fixe de divisions cellulaires (appelé lignage cellulaire) et produisent les différentes cellules du futur organe. Enfin, dans une dernière étape, les cellules ainsi formées se différencient pour former l'organe mature. En particulier, le neurone envoie un axone vers le système nerveux central et un dendrite au sein des cellules accessoires tandis que les cellules soie et socle produisent la structure cuticulaire de l'organe.

Depuis 1989, de nombreux nouveaux gènes impliqués dans la formation des organes sensoriels ont été identifiés et il est remarquable de constater que le modèle de Christine Dambly-Chaudière et Alain Ghysen est toujours valable dans ses grandes lignes aujourd'hui. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à une étape particulière de la formation des organes sensoriels : la séquence stéréotypée de divisions cellulaires qui est suivie par la cellule pI. Ce processus est influencé par les étapes de développement qui ont lieu auparavant.



Fig. 3 - Modèle de formation des organes sensoriels proposé par Christine Dambly-Chaudière et Alain Ghysen en 1989. Voir texte pour les détails.



Fig. 4 - Le complexe *achaete-scute.* Les gènes sont représentés en haut et les mutations qui ont permis de distinguer différentes régions génomiques en bas. D'après Campuzano et Modolell, 1992.

Conférer une compétence neurale à un groupe de cellules: les gènes proneuraux

Cinq gènes proneuraux: achaete, scute, lethal of scute, atonal et amos

La plus vieille étude des gènes proneuraux remonte à 1916, avec la description des premières mouches dépourvues de quelques soies et portant une mutation appelée *scute* (résumé dans Ghysen et Dambly-Chaudière, 1988). Suite à cette découverte, de nombreuses autres mutations affectant différents groupes particuliers de soies ont été identifiées. Comme ces diverses mutations sont situées dans la même région génomique que *scute* et que les phénotypes observés sont variables suivant les allèles, il semblait vraisemblable à l'époque que ces mutations touchent un complexe de plusieurs gènes mais le nombre de gènes impliqués était sujet à controverse. C'est dans les années 70-80, grâce aux études génétiques pionnières d'Antonio Garcia-Bellido en particulier, que l'on découvrira que ces mutations sont situées dans un complexe de gènes appelé **complexe** *achaete-scute*, qui comprend quatre gènes: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l'sc*) et *asense* (*ase*) (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Garcia-Bellido, 1979; Campuzano et al., 1985; Villares et Cabrera, 1987; Alonso et Cabrera, 1988; Gonzales et al., 1989 ; Fig. 4).

Ces quatre gènes possèdent un domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) capable de se fixer à l'ADN (Villares et Cabrera, 1987; Alonso et Cabrera, 1988; Gonzales et al., 1989; Murre et al., 1989). Dans les mutants perte de fonction *achaete* ou *scute*, des organes sensoriels manquent (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Garcia-Bellido, 1978; Dambly-Chaudière et Ghysen, 1987) et à l'inverse, dans les mutants gains de fonction *achaete* ou *scute*, des soies ectopiques sont produites (Garcia-Alonso et Garcia-Bellido, 1986; Campuzano et al., 1986; Rodriguez et al., 1990; Tableau 2). Les gènes *achaete* et *scute* sont donc nécessaires et suffisants pour induire la formation d'un organe sensoriel. En visualisant les cellules précurseurs à l'aide de la technique des gènes rapporteurs enhancer-trap (O'Kane et Ghering, 1987) Alain Ghysen et Cahir O'Kane ont observé que les cellules précurseurs n'apparaissent pas dans les mutants *achaete* et *scute* (Ghysen et O'Kane, 1989). Ces gènes sont donc nécessaires pour conférer à certaines cellules épithéliales la capacité à devenir une cellule précurseur.

Ces gènes sont exprimés de façon extrêmement reproductible et dynamique dans le temps. Tout d'abord exprimés à faible niveau dans des petits groupes de cellules à l'endroit où les organe sensoriels vont être formés, ils deviennent exprimés à plus fort niveau dans une seule cellule, qui correspond à la cellule précurseur du futur organe, alors que leur expression disparaît dans les cellules voisines (Romani et al., 1989; Martinez et Modolell, 1991; Skeath et Carroll, 1991; Cubas et al., 1991; Ruiz-Gomez et Ghysen, 1993). Comme attendu, dans les mutants *scute*, l'expression de *scute* est perdue dans la région où les cellules précurseurs des soies manquantes auraient dû se former (Romani et al., 1989; Cubas et al., 1991). Les gènes *achaete* et *scute* sont également les gènes proneuraux de certains neuroblastes de l'embryon. En effet, ils sont exprimés de la même manière dans un groupe de cellules puis dans des cellules isolées qui correspondent à des neuroblastes, au sein de l'épiderme ventral de l'embryon où sont produits les neuroblastes (Cabrera et al., 1987; Romani et al., 1987; Skeath

et Carroll, 1992), et les analyses de perte et gain de fonction indiquent qu'ils sont impliqués dans la formation de certains neuroblastes (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Jimenez et Campos-Ortega, 1979; White, 1980; Jimenez et Campos-Ortega, 1990; Skeath et Doe, 1996; Parras et al., 1996).

De même, d'après son patron d'expression et ses phénotypes pertes et gain de fonction, *lethal of scute* a été identifié comme étant le gène proneural de certains neuroblastes du système nerveux central de la larve (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Jimenez et Campos-Ortega, 1987; Jimenez et Campos-Ortega, 1990; Martin-Bermudo et al., 1991). Par contre, *asense*, le quatrième membre du complexe *achaete-scute*, n'est pas un vrai gène proneural. En effet, il n'est pas exprimé dans des groupes de cellules épithéliales avant la neurogenèse mais seulement dans les cellules précurseurs déjà formées du système nerveux central et périphérique (Dominguez et Campuzano, 1993; Brand et al., 1993). Dans les mutants *asense*, certains organes sensoriels manquent ou ne se forment pas correctement, ce qui suggère que la gène *asense* est requis pour la différentiation des cellules précurseurs (Dominguez et Campuzano, 1993).

Les molécules à domaine bHLH se fixent à l'ADN sur des séquences consensus appelées boîtes E (van Doren, 1991). Cette fixation a lieu seulement si les proteines codées par les gènes proneuraux forment un hétérodimère avec une autre protéine à domaine bHLH, la protéine Daughterless (Caudy et al., 1988a; Caudy et al., 1988b; Cabrera et Alonso, 1991). Ces interactions in vitro sont corroborées par des interactions génétiques in vivo entre daughterless et les gènes du complexe achaete-scute (Dambly-Chaudière et al., 1987; Jimenez, 1990). Il est intéressant de remarquer que le phénotype daughterless est plus fort que le phénotype des mutants dépourvus du complexe achaete-scute: dans les mutants daughterless, tous les organes sensoriels de l'embryon sont absents (Caudy et al., 1988a) alors que dans les mutants où la totalité du complexe achaete-scute est supprimé, certains organes sensoriels sont toujours présents (Dambly-Chaudière et Ghysen, 1987). Ces observations ont donc longtemps suggéré que d'autres gènes proneuraux à domaine bHLH participent à la formation du SNP. Et en effet, par PCR en utilisant des amorces dégénérées contre la région bHLH, ont été découverts relativement récemment deux nouveaux gènes proneuraux: atonal et amos (Jarman, 1993; Goulding, 2000; Huang, 2000). Les gènes atonal et amos ont environ 80% d'identité entre leurs régions bHLH alors qu'ils ont seulement 45% d'identité avec les régions bHLH des gènes du complexe achaete-scute (les gènes du complexe achaete-scute ont environ 70% d'identité entre eux) (Jarman et al., 1993a; Huang et al., 2000; Goulding et al., 2000). Comme les gènes proneuraux achaete, scute et lethal of scute, les gènes atonal et amos sont exprimés dans un groupe de cellules épidermiques avant le premier signe de différentiation neurale puis leur expression se restreint à une ou quelques cellules (Jarman et al., 1993a; Huang et al., 2000; Goulding et al., 2000). Dans les mutants perte ou gain de fonction, des organes sensoriels sont respectivement absents ou présents (Jarman et al., 1993a; Huang et al., 2000; Goulding et al., 2000). Le Tableau 1 donne la liste des organes dont la formation dépend des cinq gènes proneuraux.

Achaete et Scute

tous les organes sensoriels externes mécanorécepteurs mono-innervés de la larve et de l'adulte (soies, papilles...) (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Dambly-Chaudière et Ghysen, 1987) sauf les mécanorécepteurs des rangées ventrales et médiane de la marge antérieure de l'aile (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Leyns et al., 1989; Jack et al., 1991)

soies interommatidiales des yeux adultes (Sun et al., 2000)

neurones multidendritiques Cut-positifs de la larve (Jarman et al., 1993a)

organes sensoriels externes gustatifs poly-innervés de l'adulte (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978) organes sensoriels externes gustatifs poly-innervés de la larve (Dambly-Chaudière et Ghysen, 1987) certains neuroblastes du système nerveux central de la larve (Jimenez et Campos-Ortega, 1979;

White et al., 1980; Gonzales, 1989), dont le neuroblaste median MNB (Ruiz-Gomez and Ghysen, 1993) et le neuroblaste MP2 (Skeath et Doe, 1996; Parras et al., 1996).

Lethal of Scute

certains neuroblastes du système nerveux central de la larve (Jimenez et Campos-Ortega, 1979; White et al., 1980 ; Cabrera et Alonso, 1991)

Atonal

organes chordotonaux de l'adulte: organe de Johnston, organe à la jonction fémur-tibia, organe chordotonal prothoracique, organes chordotonaux scatellaires de l'haltère, organes chordotonaux du radius et de la tegula de l'aile (Jarman et al., 1995)

organes chordotonaux de l'embryon (sauf une scolopidie de lch5) (Jarman et al., 1993a)

certains neurones multidendritiques Cut-négatifs de la larve (Jarman, 1993)

photorécepteurs R8 (Jarman et al., 1994)

sensilles coeloconiques de l'antenne (Gupta et Rodrigues, 1997)

sensilles olfactives basiconiques du palpe maxillaire (Gupta et Rodrigues, 1997)

saccule de l'antenne (Gupta et Rodrigues, 1997)

neurones sensoriels de l'arista (Gupta et Rodrigues, 1997)

Amos

certains neurones multidendritiques Cut-négatifs de la larve (Huang et al., 2000) sensilles olfactives basiconiques de l'antenne (Goulding et al., 2000) sensilles olfactives trichoïdes de l'antenne (Goulding et al., 2000)

Tableau 1 – Cinq gènes proneuraux requis pour la formation d'une multitude d'organes sensoriels. Pour certains organes sensoriels, les gènes proneuraux requis n'ont pas été étudiés mais on connaît les gènes proneuraux exprimés dans la région où ils sont produits: complexe antenno-maxillaire de la larve: gènes du complexe *achaete-scute* et *amos*, mais pas *atonal* (Romani et al., 1987; Cabrera et al., 1987; Jarman et al., 1993a; Huang et al., 2000), lobes du cerveau adulte: *atonal* (Sun, 1998; Jarman et al., 1998), griffes innervées du tarse des pattes: *amos* (Goulding et al., 2000).

Un gène proneural, différents types d'organes sensoriels formés

Les analyses des mutants perte de fonction des gènes proneuraux indiquent clairement qu'un gène proneural contrôle la formation de plusieurs types d'organes morphologiquement très différents (Tableau 1). Le gène *atonal*, par exemple, est impliqué dans la formation des photorécepteurs dans le disque imaginal d'oeil, de certains neurones multidendritiques dans l'épithélium embryonaire, des organes chordotonaux dans le disque imaginal de patte... (Ainsi, les mouches portant une mutation dans un seul gène, le gène *atonal*, sont aveugles, sourdes et pratiquement insensibles aux odeurs... mais elles sont toujours fertiles !) Ces observations suggèrent fortement que d'autres facteurs agissent en combinaison avec les gènes proneuraux pour spécifier les types variés d'organes sensoriels.

D'autres gènes proneuraux non identifiés chez D. melanogaster?

Dans les segments abdominaux de la larve, il semble que tous les gènes proneuraux impliqués dans la formation des organes sensoriels aient été identifiés. En effet, dans les mutants dépourvus à la fois d'*atonal* et du complexe *achaete-scute*, deux neurones multidendritiques sont toujours présents dans chaque segment abdominal de la larve (Jarman et al., 1993a) et ces deux neurones sont absents lorsque la fonction d'*amos* est supprimée (Huang et al., 2000). En revanche, il semblerait que les gènes proneuraux potentiellement responsables du développement d'une partie du SNC de la larve et du SNP de la marge de l'aile n'aient pas encore été identifiés. En effet, les gènes *atonal* et *amos* ne sont pas détectés dans le SNC de la larve et dans la marge de l'aile (Jarman et al., 1993a; Goulding et al., 2000) donc on peut penser que ces cellules ne dépendent pas d'*atonal* et *amos* (ceci n'a pas été rapporté dans la littérature). Et dans les mutants dépourvus du complexe *achaete-scute*, une partie du SNC de la larve ainsi que les rangées de soies médianes et dorsales de la marge de l'aile sont toujours présentes (Garcia-Bellido et Santamaria, 1978; Leyns, 1989; Jack, 1991; Jimenez et Campos-Ortega, 1990).

Deux hypothèses sont possibles: soit un ou plusieurs gène(s) proneuraux n'ont pas été identifiés, soit la formation de ces cellules sensorielles ou neuronales ne dépend pas d'un gène proneural. La séquence complète du génome de *D. melanogaster* a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes bHLH et certains sont effectivement exprimés dans la region de l'embryon où apparaissent les neuroblastes (Moore, 2000; Peyrefitte, 2001). Toutefois, leur rôle potentiel au cours de la neurogenèse de l'embryon, et leur patron d'expression dans le disque d'aile, n'ont pas été analysés. S'il existe un gène proneural impliqué dans la formation de ces neurones du SNC, celui-ci ne requiert pas *daughterless*. En effet, dans les mutants zygotiques *daughterless*, certains neurones du SNC sont toujours présents, et une réduction de l'activité maternelle zygotique n'accentue pas le phénotype, suggérant que la contribution maternelle de *daughterless* n'est pas nécessaire pour la formation du SNC (Caudy et al., 1988a). Il n'a pas été réalisé à ma connaissance de clones *daughterless* mutants à l'état adulte pour voir si les soies mécanosensorielles de la marge de l'aile sont toujours présentes dans les mutants *daughterless*.

La formation de ces neuroblastes et de certains organes sensoriels pourrait être indépendante des gènes proneuraux. C'est peut-être le cas de certaines cellules précurseurs pI des scolopidies des organes chordotonaux lch5 de la larve, dans lesquelles *atonal* n'est pas détecté (zur Lage et al., 1997). La formation de ces cellules pI particulières met en jeu un mécanisme différent du modèle de la Figure 2: ces cellules *atonal*-négatives sont recrutées à côté d'une cellule pI *atonal*-positive déjà formée grâce à un signal Spitz/EGF émis par la cellule déjà formée (zur Lage et al., 1997; Okabe et Okano, 1997). Malheureusement, il n'est pas possible de vérifier que la formation de ces cellules précurseurs ne requiert pas *atonal* en analysant le phénotype des mutants *atonal*. En effet, dans les mutants *atonal*, les cellules pI

inductrices manquent donc les cellules pI induites *atonal*-négatives ne peuvent pas se former de toute façon. De façon similaire, la formation de certains neuroblastes de la corde nerveuse ventrale de l'embryon dépend d'un signal Spitz/EGF émis par la région ventrale de l'embryon (Mayer et Christiane Nüsslein-Volhard, 1988; Rutledge et al., 1992; Schweitzer et al., 1995). Pour savoir si la formation de ces neuroblastes dépend uniquement d'un signal Spitz/EGF, il serait intéressant de regarder si, dans des embryons doublement mutants pour *spitz* et *daughterless*, tous les neuroblastes de la corde nerveuse ventrale manquent.

Les gènes proneuraux confèrent-ils une identité sensorielle ?

Une certaine redondance fonctionnelle entre les différents gènes du complexe *achaete-scute*, notamment *achaete* et *scute*, a été observée à plusieurs reprises. En effet, l'absence d'un des gènes du complexe peut souvent être sauvée par les autres, que ce soit dans le SNC de la larve (Jimenez et Campos-Ortega, 1979), dans le SNP de la larve (Dambly-Chaudière et Ghysen, 1987) ou dans le SNP de l'adulte (Balcells et al., 1988; Held, 1990; Rodriguez et al., 1990). De plus, la plupart des cellules précurseurs pI qui expriment *achaete* expriment aussi *scute* (Romani et al., 1989; Cubas et al., 1991; Martinez et Modollell, 1991; Skeath et Carroll, 1991; Ruiz-Gomez et Ghysen, 1991).

Toutefois, il existe une certaine correspondance entre un gène proneural et le type d'organe sensoriel formé (Tableau 1). Par exemple, la formation de tous les organes externes mécanorécepteurs¹ dépend des gènes *achaete* et *scute* alors que la formation de tous les types d'organes chordotonaux analysés² dépend d' *atonal*. Il existe également des spécificités plus fines: sur le thorax, le développement des macrochètes DC et PSA dépend d'achaete tandis que les autres macrochètes dépendent de scute (Garcia-Bellido, 1979). Pour mieux comprendre cette possible spécificité, de nombreuses expériences d'expression ectopique de gènes proneuraux ont été réalisées et comparées aux phénotypes de perte de fonction (Tableau 2). Le message principal qui resort de ces études est que les gènes proneuraux peuvent induire, quand ils sont exprimés ectopiquement, plus de types sensoriels qu'ils n'en contrôlent réellement au cours du développement normal de D. melanogaster, mais qu'ils possèdent tout de même certaines spécificités quand ils sont exprimés ectopiquement. Ainsi, par exemple, l'expression ectopique de chacun des cinq gènes proneuraux induit la formation d'organes externes mécanorécepteurs. Toutefois, atonal ou scute ne sont pas capables d'induire des soies olfatives ectopiques dans l'aile alors qu'amos en induit (Tableau 2). La spécificité observée en expression ectopique s'explique facilement par les différences de séquences en acides aminés entre les domaines bHLH des différentes protéines proneurales (Chien, 1996). Mais comment expliquer que les gènes proneuraux spécifient au cours du développement normal de l'animal beaucoup moins de types d'organes sensoriels (Tableau 1) que ce qu'ils sont capables de spécifier en expression ectopique (Tableau 2)?

¹ sauf ceux de la marge de l'aile (Tableau 1).

 $^{^{2}}$ sauf la scolopidie la plus antérieure de l'organe chordotonal lch5 (voir plus loin).

Achaete		
hs-Gal4	organes sensoriels externes (Brand et al., 1993)	
Scute hs-scute	organes sensoriels externes: microchètes et macrochètes sur le thorax, soies campaniformes et trichoïdes sur les ailes, peignes sexuels, microchètes, soies chémosensorielles et mécanoréceptrices sur les pattes, macrochètes et microchètes sur l'abdomen (Rodriguez et al., 1990)	
hs-gal4 scabrous-gal4 109-gal4 5'-eye-scute 3'F:5.8-scute gal4-7	soies mécanosensorielles, pas de chordotonaux dans l'aile (Chien et al., 1996) organes sensoriels externes dans l'aile (Huang et al., 2000) organes sensoriels externes et quelques neurones multidendritiques dans la larve, pas d'organes chordotonaux (Huang et al., 2000) organes sensoriels externes, pas de chordotonaux (Jarman et Ahmed, 1998) photorécepteurs non R8 dans l'œil (Sun et al., 2000) photorécepteurs non R8 dans l'œil (Sun et al., 2000) photorécepteurs non R8, soies interommatidiales, macrochètes dans l'œil (Sun et al., 2000)	
Lethal of Scute hs-Gal4 gal4 ^{540.3} , gal4 ^{527.5}	soies mécanosensorielles (Brand et al., 1993) ³ organes sensoriels externes: microchètes macrochètes et soies campaniformes sur le thoras, les ailes, les pattes, la tête et l'abdomen (Hinz et al., 1994)	
Asense hs-ase	organes sensoriels externes: microchètes et macrochètes sur le thorax, soies campaniformes et trichoïdes sur les ailes, microchètes, soies chémosensorielles et mécanoréceptrices sur les pattes, macrochètes et microchètes sur l'abdomen (Dominguez et Campuzano, 1993; Brand et al., 1993)	
Atonal hs-Gal4	organes sensoriels externes avec des dentrites de type chordotonal (Jarman et al., 1993a) soies mécanosensorielles, organes chordotonaux le long des veines de l'aile (Chien et al., 1996) soies mécanosensorielles, organes chordotonaux (Jarman et Ahmed, 1998) organes sensoriels externes dans l'aile (Huang et al., 2000) organes chordotonaux dans la larue (Jarman et al., 1993a)	
384-Gal4	soies olfactives basiconiques dans le palpe maxillaire (Gupta et Rodrigues, 1997) sensilles olfactives coeloconiques et saccule dans l'antenne (Gupta et Rodrigues, 1997) sensilles olfactives coeloconiques dans l'antenne (Goulding et al., 2000)	
scabrous-gal4	organes sensoriels externes, organes chordotonaux et quelques neurones multidendritiques dans la larve (Huang et al., 2000)	
109-gal4	quelques organes externes, surtout des chordotonaux, les organes externes sont plus ou moins transformés en chordotonaux (Jarman et Ahmed, 1998) organes externes, organes chordotonaux, pas de sensilles olfactives trichoïdes dans le thorax et pas/peu dans l'aile (Goulding et al., 2000)	
neu-gal4 5'-eye-atonal 3'F:5.8-atonal	soies olfactives coeloconiques (Jhaveri et al., 2000) photorécepteurs R8 dans l'œil (Sun et al., 1998; Sun et al., 2000) photorécepteurs R8 dans l'œil (Sun et al., 1998; Sun et al., 2000)	
Amos hs-gal4 hairy-gal4 scabrous-gal4 384-gal4 109-gal4	organes sensoriels externes dans l'aile (Huang et al., 2000) organes chordotonaux, neurones multidendritiques dans l'embryon (Huang et al., 2000) organes chordotonaux, neurones multidendritiques dans l'embryon (Huang et al., 2000) sensilles olfactives coeloconiques, basiconiques et sensilles mécanosensorielles trichoïdes dans l'antenne (Goulding et al., 2000) organes sensoriels externes, organes chordotonaux, sensilles olfactives trichoïdes dans l'aile et le thorax (Goulding et al., 2000)	

Tableau 2 – Organes sensoriels formés quand *achaete* ou l'un des cinq gènes proneuraux est exprimé ectopiquement.

Il a été proposé que les protéines proneurales ectopiques activent directement l'expression d'un autre gène proneural, qui est donc lui-même responsable de la formation des organes sensoriels ectopiques (Martinez et Modolell, 1991 ; Van Doren et al., 1992 ; Culi et Modolell, 1998 ; Sun et al., 1998 ; Lai, 2003). On peut également imaginer que les protéines proneurales ectopiques séquestrent une molécule inhibitrice d'autres gènes proneuraux, comme Extramacrochaete (Ellis et al., 1990 ; Garrell et Modolell, 1990 ; Jarman et al., 1993a). Cependant, plusieurs expériences invalident ces deux hypothèses. Notamment, l'expression ectopique des gènes *lethal of scute, atonal* ou *amos* en absence d'*achaete* et de *scute* conduit toujours à la production d'organes sensoriels externes ectopiques (Hinz et al., 1994 ; Jarman et al., 1993a).

Les domaines d'expression limités des différents gènes proneuraux pourraient expliquer leur spécificité d'action. Par exemple, *lethal of scute* est exprimé seulement dans la région des neuroblastes et à aucun moment dans la région qui va produire le SNP de la larve ou les soies du thorax de l'adulte (Martin-Bermudo et al., 1991; Hintz et al., 1994; Brand et al., 1993). S'il est exprimé ectopiquement dans le thorax, des soies ectopiques apparaissent (Brand et al., 1993). On peut donc imaginer que *lethal of scute* ne contrôle pas la formation du SNP au cours du développement normal tout simplement parce qu'il n'y est pas exprimé. S'il y était exprimé, il le ferait.

Lethal of scute a probablement perdu son rôle proneural sensoriel au cours de l'évolution

La phylogénie des homogues des gènes du complexe achaete-scute chez les Insectes (Fig. 5) indique que le gène lethal of scute a dû apparaître par duplication d'un gène achaetescute relativement récemment - 100 millions d'années environ - chez un ancêtre des Diptères Schizophora, après la séparation des Nématocères (moustiques) et des Brachycères (mouches) (résumé dans Skaer et al., 2002a; Fig. 4). Le moustique Anopheles giambiae, dont le génome est totalement séquencé, possède un gène asense mais un seul homologue des trois gènes achaete-scute-lethal of scute de D. melanogaster (appelé Ag-ASH) (Wüllbeck et Simpson, 2002). Le gène Ag-ASH est exprimé dans le disque imaginal d'aile-thorax à l'endroit où les organes sensoriels vont émerger (Wüllbeck et Simpson, 2002). Il est vraissemblable que chez A. giambiae, Ag-ASH remplisse la fonction des trois gènes proneuraux achaete-scute-lethal of scute de D. melanogaster. Chez les mouches Calliphora vicina et Ceratitis capitata, un gène lethal of scute et un seul gène correspondant à achaete et à scute sont présents (Wüllbeck et Simpson, 2000; Pistillo et al., 2002; résumé dans Skaer et al., 2002a). Le gène correspondant à achaete et à scute est aussi exprimé dans le disque imaginal d'aile-thorax à l'endroit où les organes sensoriels vont émerger chez ces deux espèces. Il est donc raisonnable de penser que chez l'ancêtre d'A. giambiae et de D. melanogaster, le gène ancestral achaete-scute-lethal of scute était exprimé dans le SNP.

Chez *Calliphora vicina* et *Ceratitis capitata*, comme chez *D. melanogaster*, *lethal of scute* est exprimé dans la région du SNC où se forment les neuroblastes dans l'embryon (Wullbeck et Simpson, 2000; Pistillo et al., 2002). Il est aussi exprimé dans le SNP du disque imaginal d'aile-thorax chez *Ceratitis capitata*. Par contre, aucune expression n'est détectée



Fig. 5 - Arbre phylogénétique des homologues achaete-scute **chez les Insectes.** *ASH:* achaete-scute homologue, Ag: Anopheles gambiae, b: butterfly, Cc: Ceratitis capitata, Cn: Cnidarian, Cs: Cupiennus salei, Cv: Calliphora vicina, Dm: Drosophila melanogaster, Dy: Drosophila yakuba, m: mouse, *Pt: Phormia terranovae.* D'après Skaer et al., 2002.



Fig. 6 - Evolution des gènes du complexe *achaete-scute* **chez les Diptères.** Les gènes exprimés dans le SNP sont en verts, ceux qui ne sont pas détectés dans le SNP sont en rouge.Voir texte pour détails. D'après Skaer et al., 2002.

dans le disque chez *Calliphora vicina* et chez *D. melanogaster* (Wullbeck et Simpson, 2000; Pistillo et al., 2002 ; Fig. 6). Ces observations indiquent donc que l'expression de *lethal of scute* dans le SNP a été perdue chez *Calliphora vicina* et chez *D. melanogaster*. On peut imaginer deux scénarios. Selon le premier, *lethal of scute* a perdu son patron d'expression dans le SNP au moment de son apparition par duplication, entre l'émergence d'*A. gambiae* et de *Calliphora vicina*. Puis dans la branche qui a conduit à *Ceratitis capitata, lethal of scute* a acquis un nouveau patron d'expression dans le SNP. Selon le deuxième, *lethal of scute* a conservé son patron d'expression dans le SNP suite à la duplication mais ce patron a été perdu deux fois de façons indépendantes chez *D. melanogaster* et *Calliphora vicina*.

La formation de certains organes chordotonaux ne dépend pas d'atonal

Notons pour finir que la spécificité *atonal*/organe chordotonal au cours du développement normal de *D. melanogaster* ne semble pas totale. En effet, la scolopidie la plus antérieure de l'organe chordotonal lch5 chez l'embryon est toujours présente dans les mutants nuls *atonal* alors que toutes les autres scolopidies sont absentes (Jarman et al., 1995). La cellule pI de cette scolopidie est formée de façon classique à partir d'un groupe proneural *atonal*-positif et non par recrutement (zur Lage et al., 1997). De façon intéressante, en plus d'*atonal, scute* est exprimé dans cette cellule (Vaessin et al., 1994) et dans les mutants dépourvus à la fois d'*atonal* et du complexe *achaete-scute*, la scolopidie est absente (Jarman et al., 1995). De plus, dans les mutants dépourvus du complexe *achaete-scute*, une scolopidie de lch5 manque dans la plupart des cas (Tableau 1 dans Huang et al., 2000). Toutes ces observations suggèrent donc que cette scolopidie dépend de *scute*.

D'autres cellules pI pourraient aussi donner des organes chordotonaux en absence d'*atonal*. Ainsi, *scute* et *lethal of scute* sont exprimés dans certaines cellules pI des organes chordotonaux des disques d'aile et de patte (Jarman et Ahmed, 1998 ; Jarman, 1993). De plus, dans les embryons mutants *cut*, les organes sensoriels externes sont transformés en organes chordotonaux mais les cellules précurseurs ainsi transformées n'expriment pas *atonal* (Jarman et Ahmed, 1998). Toutes ces observations semblent donc indiquer que la formation de certains organes chordotonaux ne dépend pas du gène *atonal*.

Les gènes proneuraux chez les autres animaux

En dehors des Métazoaires, aucun homologue d'un gène proneural n'a été identifié (Ledent et Vervoort, 2001). L'espèce la plus éloignée de *D. melanogaster* chez qui on a trouvé un homologue d'un gène proneural est l'hydre *Hydra vulgaris* (Grens et al., 1995 ; Fig. 5). Ce gène a été remarquablement bien conservé au cours de l'évolution puisqu'il est capable de sauver le phénotype des mutants dépourvus du complexe *achaete-scute* chez *D. melanogaster*. Chez l'hydre, ce gène n'est pas exprimé dans les neurones mais dans des cellules interstitielles qui sont peut-être à un stade intermédiaire de différenciation en nématocystes.

Chez les Vertébrés, de nombreux homologues des gènes proneuraux du complexe *achaete-scute* (nommés *ash* pour *achaete-scute* homolog) et d'*atonal* (nommés *ath*) ont été

identifiés (résumé dans Hassan et Bellen, 2000 et dans Bertrand et al., 2002). Dans des souris mutantes pour les gènes Mash1, Math1 ou Math5, certains neurones sont absents. À l'inverse, la surexpression de Math1 dans le tube neural de poulet accélère la différenciation des neurones. Ces phénotypes suggèrent donc que les homologues des gènes proneuraux chez les Vertébrés contrôlent la formation des neurones de la même manière que ceux de D. melanogaster. De plus, comme chez D. melanogaster, les gènes proneuraux sont d'abord exprimés dans un groupe de cellules puis l'expression du gène proneural se restreint à une seule cellule, qui délamine et devient alors la cellule précurseur de plusieurs neurones (résumé dans Bertrand et al., 2002). Cependant, le mode de formation des neurones est différent chez les Vertébrés. Notamment, les cellules qui se mettent à exprimer les gènes proneuraux font déjà partie d'un neuroépithélium engagé dans la voie de différenciation neurone/cellule gliale et elles se divisent activement. L'expression d'un gène proneural réduit alors l'activité mitotique des cellules et favorise leur différenciation en neurones. Bien que les ressemblances avec D. melanogaster ne soient pas totales, toutes ces observations montrent bien que les gènes proneuraux sont aussi impliqués dans la formation des cellules nerveuses chez les Vertébrés.

Chez *C. elegans*, qui est beaucoup plus proche de *D. melanogaster* que les Vertébrés (Aguinaldo et al., 1997, Adoutte et al., 2000), un homologue d'*atonal* a été identifié (Zhao et Emmons, 1995). Il est requis pour la formation de certains neuroblastes et certains organes sensoriels (Zhao et Emmons, 1995 ; Portman et Emmons, 2000).

Toutes ces observations indiquent donc que les gènes proneuraux contrôlent aussi la formation des cellules nerveuses chez les autres animaux Bilateria.

Restreindre la compétence neurale à une seule cellule: Notch et l'inhibition latérale

Selon le modèle de Christine Dambly-Chaudière et Alain Ghysen de 1989 (Fig. 2), une fois le groupe proneural spécifié, deux étapes sont distinguées. Tout d'abord, une seule cellule du groupe devient la cellule pI (« commitment of one cell »). Ensuite, cette cellule inhibe ses voisines (« lateral inhibition »). En fait, ces deux étapes mettent en jeu la même voie de signalisation - la voie Notch - et on considère maintenant que ces deux étapes pourraient être plus ou moins confondues. En résumé, l'émergence d'un seul précurseur au sein du groupe proneural est basée sur un mécanisme de communication intercellulaire. Au départ, toutes les cellules du groupe expriment à peu près le même niveau de gène proneural et sont équivalentes. Ces cellules tendent à s'inhiber mutuellement (c'est l'inhibition mutuelle). Par un processus autocatalytique, des différences s'établissent entre les cellules et celle qui devient la moins inhibée et la plus inhibante devient la cellule précurseur. Cette cellule inhibe totalement ses voisines (c'est l'inhibition latérale. Les deux types d'inhibition sont en fait maintenant regroupées sous le même terme inhibition latérale). Cette inhibition entre cellules équivalentes a été suggérée en 1940 par Wigglesworth. Mentionant que plusieurs modèles pouvaient rendre compte de ce processus, il proposa alors que les cellules sont en compétition pour un facteur en quantité limitante qui est essentiel à la formation d'une cellule pI (Wigglesworth, 1940). En fait, cette inhibition entre cellules n'est pas indirecte, comme l'avait proposé Wigglesworth, mais bien directe : les cellules empèchent leurs voisines d'adopter un devenir neural en envoyant un signal inhibiteur transmis par le récepteur Notch.

La voie de signalisation Notch

Notch est un récepteur transmembranaire qui peut être activé par deux ligands qui sont eux-aussi transmembranaires: Delta et Serrate (résumé dans Artavanis-Tsakona et al., 1999 et dans Baron, 2003). La liaison du récepteur Notch à un de ses ligands entraîne le clivage de la protéine Notch, ce qui libère la région intracellulaire de Notch dans le cytoplasme de la cellule qui a reçu le signal Notch. La région intracellulaire de Notch est alors transloquée dans le noyau où elle se lie au facteur de transcription Su(H). En absence de Notch, Su(H) est fixé à l'ADN et réprime la transcription en recrutant des histone désacétylases. La liaison de Notch à Su(H) enlève les histone désacétylases et conduit au recrutement de la protéine Mastermind et de plusieurs histones acétylases, ce qui active la transcription. La protéine Su(H) se fixe aux séquences régulatrices des gènes du complexe E(Spl) et la cascade de signalisation Notch active la transcription de ces gènes.

De nombreuses molécules sont capables de moduler cette voie de signalisation, telles que Hairless, Numb et Neuralized (Brou, 1994; Schweisguth et al, 1998 et suite de l'introduction). La voie Notch est aussi impliquée dans la formation de très nombreux tissus, que ce soit chez *D. melanogaster*, *C. elegans* ou chez les Mammifères. Par exemple, chez *D. melanogaster*, Notch contrôle la formation des neuroblastes et des organes sensoriels (voir cidessous) mais aussi la différenciation des cellules neurales et gliales, la myogenèse, la formation des veines et de la marge de l'aile, la formation des chambres à œufs, etc.

L'inhibition latérale: choix aléatoire de la cellule précurseur

Les protéines Notch, Delta et toute la machinerie de transduction du signal Notch sont présentes dans toutes les cellules du groupe proneural (Fehon et al., 1991; Kooh et al., 1993). Mais comment l'utilisation de la voie de signalisation Notch aboutit-elle à la sélection de seulement une cellule isolée au sein d'un groupe proneural ? Tout d'abord, plusieurs expériences indiquent l'existence d'une communication - et en quelque sorte une compétition - entre toutes les cellules du groupe proneural. Une des premières expériences informatives a été réalisée chez le criquet (Taghert et al., 1984 ; Doe et Goodman, 1985). Si un neuroblaste et toutes ses cellules adjacentes sont éliminés, le neuroblaste ne se forme pas; mais si on tue uniquement le neuroblaste avant qu'il commence sa croissance, alors une cellule voisine produit le neuroblaste en question. De même, par des expériences classiques de génétique, Curt Stern a mis en évidence cette communication intercellulaire en réalisant des clones de cellules mutantes pour le gène achaete dans le thorax (Stern, 1954). Si des cellules sauvages sont présentes là où se forme une soie de façon reproductible, alors la soie se forme au bon endroit, mais si un clone de cellules achaete mutantes est présent à cette position, alors une soie peut se former un peu plus loin à partir du tissu sauvage le plus proche de la position normale. Ces deux séries d'expériences indiquent bien que toutes les cellules du groupe proneural ont la capacité de devenir la cellule précurseur mais que suite à une communication entre toutes les cellules du groupe, seule une cellule est spécifiée.

Toutefois, ces résultats ne permettent pas de savoir si les cellules interagissent directement entre elles en envoyant des signaux inhibiteurs ou indirectement en rentrant en compétition pour un facteur activateur, comme le pensait Wigglesworth. C'est l'étude des mutations neurogéniques chez *D. melanogaster* qui a permis de trancher entre ces deux alternatives. Dans les mutants neurogéniques, dans lesquels un des composants de la voie Notch est absent, à peu près toutes les cellules du groupe proneural deviennent des cellules précurseurs (phénotype neurogénique, Lehmann et al., 1983 ; Hartenstein et Posakony, 1990 ; Heizler et Simpson, 1991) et à l'inverse, l'activation ectopique de la voie Notch conduit toutes les cellules du groupe proneural à se différencier en cellules épidermiques (Lieber et al., 1993; Rebay et al., 1993; Struhl et al., 1993). Ces résultats indiquent que Notch agit comme un signal inhibiteur qui empêche les cellules de se différencier en cellules précurseurs. Les cellules interagissent donc directement entre elles en envoyant des signaux inhibiteurs.

L'étude de mosaïques de cellules exprimant différentes quantités des gènes *Notch* et *Delta* a permis de mieux comprendre comment les communications intercellulaires pouvaient conduire à la sélection d'une seule cellule (Heizler et Simpson, 1991). En particulier, les cellules sauvages deviennent préférentiellement des cellules précurseurs si les cellules adjacentes ont moins de *Delta* (celles-ci envoient moins de signal inhibiteur), et à l'inverse, elles donnent des cellules épidermiques si les cellules adjacentes ont plus de *Delta* (celles-ci envoient plus de signal inhibiteur). C'est donc le niveau d'inhibition émis (Delta) et reçu (Notch) relativement aux cellules voisines qui contrôle le destin des cellules. De plus, ce type d'expérience a permis de mettre en évidence de manière élégante que Notch est le récepteur et Delta le ligand du signal inhibiteur.

Le modèle de la boucle autocatalytique transcriptionnelle Notch-E(Spl)-gène proneural-Delta

Toutes ces expériences laissaient donc penser qu'il existe une boucle autocatalytique capable d'amplifier des petites différences entre cellules du même groupe proneural. Il avait été remarqué que les cellules qui expriment un gène proneural à un niveau plus élévé que leurs voisines vont se différencier préférentiellement en cellule précurseur (Cubas et al., 1991, Heitzler et al., 1996). Ceci suggérait donc que de petites différences de niveau d'expression des gènes proneuraux pouvaient s'accentuer et conduire à la spécification d'une seule cellule. Les études qui ont suivi ont tenté de décortiquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la boucle autocatalytique (Schweisguth, 1995; Heizler et al., 1996; Fig. 7). Tout d'abord, les gènes proneuraux activent directement la transcription du gène *Delta* (Hinz et al., 1994; Kunish et al., 1994; Heitzler et al., 1996) et à l'inverse, dans les mutants *achaete-scute*, la quantité de Delta est plus faible (Ghysen et al., 1993; Kunish et al., 1994). Ainsi, les cellules contenant plus de gène proneural doivent avoir un niveau plus élevé de Delta. Dans les cellules voisines, l'activation de la voie de signalisation Notch active l'expression des gènes E(Spl) et conduit à l'accumulation des protéines E(Spl) (Jennings et al., 1994; Hinz et al., 1995; Bailey et Posakony, 1995; Lecourtois et Schweisguth, 1995; de



Fig. 7 - Modèle de la boucle autoamplificatrice Notch-Delta au cours de l'inhibition latérale. L'activation du récepteur Notch conduit à la diminution de la quantité de son récepteur Delta. D'après Schweisguth et al., 1996.

Celis et al., 1996). Celles-ci inhibent l'expression et/ou l'activité des gènes proneuraux (voir paragraphe suivant). Cette inhibition peut ainsi conduire à la diminution de la transcription de *Delta*, et donc à une baisse de l'activité inhibitrice de la cellule. Ainsi, d'après ce modèle, une cellule qui avait légèrement plus de protéine proneurale que ses voisines devient moins inhibée et plus inhibante et peut devenir la cellule précurseur.

La délétion de la totalité du complexe E(Spl) conduit à un phénotype neurogénique très fort (Lehman et al., 1983), indiquant que les gènes E(Spl) sont bien requis pour l'inhibition latérale. Mais par quel mécanisme les protéines E(Spl) inhibent l'action des gènes proneuraux ? Il a été proposé au départ que les protéines E(Spl) inhibent directement l'expression des gènes proneuraux (Knust et al., 1992; Hinz et al., 1994; Oellers et al., 1994; Martin-Bermudo et al., 1995). En fait, des données récentes indiquent que cette inhibition directe par fixation sur le promoteur du gène scute aurait lieu uniquement au niveau des enhancers spécifiques de la cellule précurseur (Culi et Modolell, 1998). Les protéines E(Spl) inhiberaient donc l'activité des gènes proneuraux par un autre mécanisme. De façon étonnante, les protéines E(Spl) dépourvues de leur domaine basique de liaison à l'ADN semblent toujours avoir une activité résiduelle (Giebel et Campos-Ortega, 1997 ; Nakao et Campos-Ortega, 1996 ; Oellers et al., 1994 ; Giagtzoglou et al., 2003), bien que cela reste controversé (Jimenez et Ish-Horowitcz, 1997). On pense donc que les protéines E(Spl) séquestrent et inhibent des activateurs de la transcription (Alifragis et al., 1997 ; Kageyama et Nakanishi, 1997) ou bien se fixent à l'ADN de façon indirecte en se fixant à des protéines de liaison à l'ADN indéterminées et répriment les gènes cibles en amont des gènes proneuraux (Culi et Modolell, 1998; Nakao et Campos-Ortega, 1996; Giagtzoglou et al., 2003).

Modification du modèle: le choix n'est pas aléatoire pour les neuroblastes et les macrochètes

L'exemple le plus étudié et le plus clair d'inhibition latérale aléatoire au cours du développement est la formation des microchètes sur le thorax de l'adulte. Ces soies sont réparties uniformément en rangées le long de l'axe antéro-postérieur, et leur nombre est

légèrement variable d'un individu à l'autre (Simpson et al., 1999). Les cellules pI de ces organes apparaissent de façon isolée à des positions aléatoires au sein de groupes proneuraux en forme de bandes antéro-postérieures (résumé dans Simpson et al., 1999).

Contrairement aux microchètes, les neuroblastes apparaissent à des positions très reproductibles au sein de l'épithélium ventral de l'embryon, même si la voie Notch est requise pour restreindre la compétence à un seul neuroblaste (Lehmann et al., 1983). Pour tester l'importance du contrôle transcriptionel de *Delta* par les gènes proneuraux, postulé par le modèle de la boucle autocatalytique (Fig. 7), les gènes *Notch* et *Delta* ont été exprimés de manière uniforme en absence des gènes endogènes avec le système UAS-Gal4 (Seugnet et al., 1997). Dans ce contexte, la boucle autocatalytique ne peut pas avoir lieu, et pourtant, la ségrégation des premiers neuroblastes a lieu correctement. Ces résultats indiquent donc que le contrôle transcriptionel de *Delta* n'est pas requis pour spécifier le neuroblaste et que le modèle précédent de la boucle auto-catalytique ne s'applique pas aux neuroblastes.

De même, les macrochètes du thorax occupent des positions fixes à la surface du thorax et les cellules précurseurs de ces grandes soies apparaissent toujours à une position excentrique et reproductible d'un individu à l'autre au sein du groupe proneural (Cubas et al., 1991; Skeath and Carroll, 1991; Cubas et Modolell, 1992). Il semble donc que le choix de la cellule précurseur ne soit pas aléatoire, même si la voie Notch est requise pour restreindre la compétence à une seule cellule. La quantité de protéines proneurales varie fortement selon les régions d'un épithélium et ce patron d'accumulation semble très reproductible (Cubas et al., 1991; Skeath and Carroll, 1991; Cubas et Modolell, 1992). Il est donc possible que le choix soit biaisé par les variations locales d'activité des protéines proneurales au sein des cellules du groupe proneural (Jan et al., 1995; Cubadda et al., 1997; Haenlin et al., 1997; Simpson, 1997), la cellule ayant le plus de protéines proneurales se différenciant toujours en cellule précurseur. Le niveau d'activité des protéines proneurales est controlé par de très nombreux gènes, dont les gènes de prépattern (résumé dans Calleja et al., 2002, 1ère étape du modèle de la Fig. 3) et ceux codant des protéines inhibitrices comme Extramacrochaete, qui possédent un domaine HLH sans domaine basique de fixation à l'ADN et qui sont capables de séquestrer les protéines proneurales (résumé dans Simpson, 1997).

Ce modèle de biais a même été poussé à l'extrême pour les neuroblastes et les macrochètes (Muskavitch, 1994; Seugnet et al., 1997): un mécanisme indépendant de la voie Notch pourrait spécifier la position de la cellule précurseur et la signalisation Notch serait juste requise pour maintenir un niveau global d'inhibition des cellules du groupe proneural. Dans ce cas, la boucle autocatalytique ne serait pas nécessaire pour spécifier la cellule précurseur. Notons toutefois que ce modèle extrême ne peut pas rendre compte de la formation des microchètes car les observations des mosaïques de cellules exprimant différentes quantités des gènes *Notch* et *Delta* (Heitzler et Simpson, 1991) indiquent que dans ce cas, le niveau de Delta et de Notch entre les cellules contrôle bien le destin des cellules.

En conclusion, il semble que la voie Notch puisse empêcher la différenciation des cellules du groupe proneural en cellules précurseurs, mais que d'autres mécanismes complexes soient impliqués dans la détermination de la position de la cellule précurseur. Ces mécanismes semblent au moins en partie indépendants des gènes proneuraux et de la voie Notch dans l'embryon. En effet, dans les embryons mutants dépourvus des contributions

maternelles et zygotiques du gène *daughterless*, les neuroblastes délaminent toujours normalement (résultats non publiés de Brand et Campos-Ortega mentionnés dans Brand et al., 1993). De plus, la cellule précurseur *ase-lacZ*-positive qui produit un organe sensoriel dépendant d'*achaete-scute* à la position A dans l'embryon sauvage apparaît à la bonne position avant de disparaître dans les mutants *achaete-scute* (Jarman et al., 1993b). De même, dans les mutants *Notch* dépourvus à la fois des contributions maternelle et zygotique, les premières cellules précurseurs des organes sensoriels ainsi que les neuroblastes apparaissent aux bonnes positions avant d'être rejointes par des cellules précurseurs ectopiques (Ghysen et al., 1989 ; Goriely et al., 1991 ; Seugnet et al., 1997).

Les cellules du groupe proneural pourraient inhiber leurs voisines à grande distance

Il est intéressant de noter que les ligands et récepteurs du signal inhibiteur sont tous deux membranaires, suggérant que les signaux inhibiteurs ont lieu aux points de contacts entre les cellules, c'est-à-dire à très courte distance. Toutefois, le signal inhibiteur doit être capable d'atteindre les cellules situées à environ deux-trois cellules d'écart car au moment où une cellule précurseur est spécifiée dans le thorax, toutes les cellules avoisinantes situées deux-trois cellules plus loin deviennent épidermiques. De plus, les cellules situées dans des clones mutants pour Delta sont capables de recevoir un signal inhibiteur émis par les cellules sauvages situées à deux-trois cellules d'écart (Renaud et al., 2001). En utilisant un promoteur Gal4 très spécifique – exprimé dans les cellules pI qui viennent d'être spécifiées – et une GFP très stable et fortement exprimée, de très longs prolongements cytoplasmiques d'environ 2 à 3 cellules de longs ont pu être observés chez les cellules précurseurs qui viennent d'être sélectionnées (Roegiers et al., 2001a; Renaud et al., 2001; de Joussineau et Alexandre, présentation au congrès NeuroFly, 2002). Ces prolongements se rétractent ensuite et disparaissent au moment où la cellule entre en division. On peut imaginer que toutes les cellules du groupe proneural émettent de tels prolongements et donc que les signaux inhibiteurs ont une action sur les cellules situées à 2-3 cellules d'écart.

Produire des organes sensoriels différents

Une fois qu'une cellule précurseur est sélectionnée au sein du groupe proneural, cette cellule se met à accumuler des protéines spécifiques de toutes les cellules précurseurs sensorielles telles que Asense (Dominguez et Campuzano, 1993 ; Brand et al., 1993), Senseless (Nolo et al., 2000), Hindsight (Yip et al., 1997 ; Pickup et al., 2002), Neuromusculin (Kania et al., 1993) ou Couch potato (Bellen et al., 1992). Au moment où ces protéines commencent à s'accumuler, l'expression des gènes proneuraux s'arrête (Cubas et al., 1991). Puis la cellule précurseur, appelée cellule précurseur primaire (pI), se divise et produit les différentes cellules qui forment un organe sensoriel.

Il existe plus d'une cinquantaine de types d'organes sensoriels différents chez *D*. *melanogaster* (voir annexe). Quels sont donc les mécanismes qui conduisent à la formation de cette extraordinaire diversité au cours du développement ? Comme nous l'avons vu au début de l'introduction, les gènes proneuraux sont responsables de la formation de différentes

catégories d'organes sensoriels (Tableau 1). Ils contribuent ainsi partiellement à la mise en place de cette diversité. Deux autres molécules qui agissent en combinaison avec les gènes proneuraux pour spécifier différents organes ont été identifiées. Ce sont deux facteurs de transcription exprimés dans des sous-ensembles d'organes sensoriels.

Organe sensoriel externe ou interne!? les gènes atonal et cut

Les organes sensoriels externes se distinguent des organes sensoriels internes (aussi appelés organes chordotonaux) principalement par la présence d'une structure cuticulaire (soie, papille...) qui émerge à la surface de l'animal. Dans les organes chordotonaux, la cellule qui entoure le dendrite du neurone sensoriel est l'équivalent de la cellule gaine des organes mécanosensoriels externes. Elle est appelée **cellule scolopale** car elle produit une structure particulière riche en filaments d'actine, appelée elle-même **scolopale** (Fig. 8). Certaines ressemblances morphologiques ont été remarquées entre ces deux types d'organes chez d'autres Insectes et chez les Crustacés (voir par exemple Schmidt et Gnatzy, 1984 et Keil, 1997). Mais la meilleure démonstration que ces organes ont des points communs a été obtenue chez *D. melanogaster*.

Dans des mutants affectant le gène *cut*, les organes sensoriels externes sont positionnés correctement mais ils sont transformés en organes sensoriels internes : il n'y a plus de soie ou papille à la surface de l'animal. De plus, cette transformation touche la morphologie des neurones et des cellules ainsi que leurs propriétés antigéniques (Bodmer et al., 1987 ; Merrit et al., 1997) mais les projections axonales sont peu affectées (Merritt et al., 1993). Le gène *cut* code un facteur de transcription à homéodomaine (Blochlinger et al., 1990). Il est exprimé dans les cellules précurseurs pI des organes externes et leur descendance mais pas dans celles des organes internes (Blochlinger et al., 1988 ; Blochlinger et al., 1990 ; Blochlinger et al., 1993). Dans l'organe externe mature, Cut s'accumule préférentiellement dans les cellules soie et socle de l'organe (Blochlinger et al., 1988). Comme on pouvait s'y attendre, son expression ectopique conduit à la transformation des organes chordotonaux en organes externes (Blochlinger et al., 1991). Le gène *cut* est donc l'exemple typique d'un **gène sélecteur**, c'est-à-dire un gène contrôlant le choix entre deux identités alternatives (Garcia-Bellido, 1975 ; résumé dans Mann et Carroll, 2002).

Comme *cut*, les gènes du complexe *achaete-scute* sont exprimés dans les cellules précurseurs des organes externes mais pas dans les organes internes alors que le gène *atonal* est présent seulement dans les organes internes. Quel est donc le lien entre *cut* et les gènes proneuraux? L'expression de *cut* dépend des gènes du complexe *achaete-scute* (Blochlinger et al., 1991). Et dans les mutants *achaete-scute*, l'expression ectopique de *cut* transforme les organes internes en organes externes mais ne conduit pas à la formation d'organes externes supplémentaires (Blochlinger et al., 1991). Le gène *cut* agit donc uniquement sur des cellules précurseurs déjà formées.

Des expériences d'expression ectopique indiquent qu'*atonal* conduit à la formation d'organes chordotonaux ectopiques en inhibant l'accumulation de Cut, mais il n'a pas d'effet sur la transcription de *scute* (Jarman et Ahmed, 1998). Le gène *atonal* spécifie donc le type chordotonal en empêchant l'action de Cut. Le gène *atonal* agit-il seulement en inhibant



Fig. 8 - Les organes mécanosensoriels externes et internes chez *D. melanogaster.* (A) organe mécanosensoriels externe, (B) organe mécanosensoriel interne ou chordotonal. D'après Merritt, 1997.

l'action de Cut ou induit-il également le développement de caractères de type chordotonaux ? De façon surprenante, il semble qu'*atonal* ne soit pas requis pour former un organe chordotonal. En effet, dans les mutants *cut*, *atonal* n'est pas exprimé dans les cellules précurseurs des organes externes transformés en organes chordotonaux (Jarman et Ahmed, 1998). Le type mécanosensoriel par défaut chez *D. melanogaster* pourrait donc être le type chordotonal.

Le gène *cut* est présent chez l'homme et la souris. Le gène de l'homme ou de la souris est capable de transformer les organes chordotonaux en organes externes et de sauver une partie du phénotype *cut* chez *D. melanogaster* (Ludlow et al., 1996). L'ancêtre des Bilateria possédait donc un gène *cut* qui a été relativement bien conservé au cours de l'évolution. Chez *D. melanogaster*, *cut* est impliqué dans de nombreux autres processus de développement comme la formation des tubes excréteurs de Malpighi, des cellules folliculaires de l'ovaire et des muscles. On peut donc imaginer que chez l'ancêtre des Bilateria, *cut* remplissait certaines de ces fonctions, puis qu'il a été recruté pour contrôler le choix organes sensoriels externes/internes lors de la formation du système nerveux périphérique.

Mono-innervé mécanosensoriel ou poly-innervé gustatif!? Le gène pox-neuro

Les organes mécanosensoriels externes de *D. melanogaster* sont tous innervés par un seul neurone alors que les organes gustatifs externes sont innervés par plusieurs neurones. Le nombre de neurones innervant les organes gustatifs est variable : on observe 2 neurones pour



Fig. 9 - Schéma d'une soie gustative du labelle de *D. melanogaster*. D'après Ray et al., 1993.

les organes vp5/p6 et dh1/h3 des segments abdominaux de la larve et les papilles du labelle de l'adulte (dont un mécanosensoriel), 3 neurones pour les organes vbd/vk des segments thoraciques de la larve et 5 neurones (dont un mécanosensoriel) pour la plupart des soies gustatives des pattes et du labelle (Fig. 9 ; voir annexe). Comme les organes mécanosensoriels, les organes gustatifs possèdent une cellule gaine, une cellule soie et une cellule socle. Une petite cellule gliale a également été observée dans certains cas chez *D. melanogaster* et chez différents Insectes (Lawrence, 1966 ; Martini et Schmidt, 1983 ; Ray et al., 1993). De plus, les organes gustatifs ont des projections axonales et des dendrites différents de ceux des organes mécanosensoriels (Fig. 2).

Comme *cut* pour la décision organe sensoriel externe/interne, le gène *pox-neuro* spécifie les deux identités alternatives mécanosensoriel/gustatif. Pox-neuro est un facteur de transcription qui posséde un motif Paired. Il s'accumule spécifiquement dans les cellules précurseurs des organes gustatifs et leur descendance mais pas dans les organes externes mécanosensoriels (Bopp et al., 1986 ; Dambly-Chaudière et al., 1992). Dans les mutants *pox-neuro*, les organes gustatifs de la larve et de l'adulte sont transformés en organes mécanosensoriels (Dambly-Chaudière et al., 1992 ; Awasaki et Kimura ; 1997 ; Awasaki et Kimura ; 2001). En revanche, l'expression ectopique de *pox-neuro* dans l'embryon et dans l'adulte produit la transformation inverse (Dambly-Chaudière et al., 1992 ; Nottebohm et al., 1994). Pox-neuro spécifie à la fois la morphologie, le nombre de cellules et les projections axonales des organes gustatifs.

De plus, Pox-neuro semble avoir une autre fonction tout à fait indépendante de la précédente au cours du développement des organes sensoriels. Dans les organes gustatifs matures, Pox-neuro est détecté spécifiquement dans une seule cellule (Awasaki et Kimura, 2001). Cette cellule serait le neurone mécanosensoriel (Werner Boll et Markus Noll, communication personnelle). De façon surprenante, cette accumulation tardive de Pox-neuro a également lieu dans les neurones de certains organes non gustatifs, les organes mécanosensoriels. En fait, il semble que Pox-neuro soit présent dans les neurones mécanosensoriels de tous les organes en forme de soie, qu'ils soient gustatifs ou mécanosensoriels. Par contre, il est absent des organes externes en forme de papille. Ce patron d'expression très particulier est sûrement à rapprocher du phénotype des larves poxneuro. Alors qu'il n'y a pas de défaut au 1^{er} stade larvaire, les soies des larves de 2^{ème} et 3^{ème} stade larvaire ont toutes une forme de petit dôme ou papille (Awasaki et Kimura, 2001 ; Werner Boll et Markus Noll, communication personnelle). Normalement, après chaque mue, la soie est perdue puis reformée par la cellule soie chez D. melanogaster et chez les autres Insectes (Gnatzy et Tautz, 1977). Il semble donc que dans les mutants pox-neuro, la cellule soie ne soit pas capable de reformer la soie. Comme Pox-neuro s'accumule dans le neurone des soies, on peut imaginer que le neurone envoie un signal à la cellule soie pour lui indiquer de produire une soie. Dans les mutants dépourvus des gènes BarH1 et BarH2, les papilles sont transformées en soies dans l'embryon alors que leur surexpression conduit à la transformation réciproque (Higashijima et al., 1992). Le lien potentiel entre pox-neuro et les gènes BarH1 n'a pas été étudié.

Étant donné le nombre important d'organes sensoriels différents présents chez *D*. *melanogaster*, d'autres gènes de spécification de type Cut ou Pox-neuro doivent probablement être impliqués dans la formation de différents types sensoriels. Ils restent à découvrir.

Produire des cellules différentes : les divisions asymétriques

Pour chaque type d'organe sensoriel, la cellule précurseur pI suit un patron de divisions cellulaires très précis et extrêmement reproductible (Bodmer et al., 1989). Les divisions des cellules précurseurs sensorielles sont appelées divisions asymétriques car elles produisent deux cellules filles différentes.

XXème siècle: différents lignages pour divers organes sensoriels

Lors de mon arrivée au laboratoire pour mon DEA, on venait de découvrir, dans l'équipe de Véronica Rodrigues et au laboratoire, que les quatre cellules des microchètes du thorax (cellule soie, cellule socle, cellule gaine et neurone) proviennent d'une cellule précurseur pI qui produit cinq cellules (Reddy et Rodrigues, 1999a ; Gho et al., 1999 ; Fig. 10). La division de la cellule pI donne deux cellules précurseurs secondaires (pII): pIIa et pIIb. La cellule pIIa produit alors les cellules soie et socle tandis que la cellule pIIb donne une



Fig. 10 - Le lignage des microchètes du thorax proposé par Gho et al., 1999 et Reddy et Rodrigues, 1999. (A) Vue dorsale de la tête et du thorax de *D. melanogaster* en microscopie électronique à balayage. Le thorax est couvert de microchètes. (B) Schéma des quatre cellules d'une microchètes et de sa cellule gliale associée. (C) Modèle de lignage proposé par Gho et al., 1999 et Reddy et Rodrigues, 1999. (En fait, la cellule gliale meurt par apoptose deux heures environ après sa formation (Fichelson et Gho, 2002)).


Fig. 11 - Différents modèles de lignage sensoriel proposés depuis 1999. Seul le premier article dans lequel a été proposé chaque lignage est indiqué.

cellule précurseur pIIIb et une cellule gliale qui migre et ne reste pas associée à l'organe. La cellule pIIIb se divise ensuite et donne le neurone et la cellule gaine. L'ancien modèle qui proposait que la cellule précurseur donne simplement les quatre cellules de l'organe était donc faux (voir l'historique du lignage des microchètes dans l'article 4).

Mais qu'en était-il du lignage des autres organes sensoriels ? Les observations indiquaient que les différents types d'organes sensoriels étaient formés par des lignages cellulaires très variés : le nombre de divisions cellulaires et le destin des différentes cellules filles apparaissaient comme très variables selon le type d'organes (Fig. 11). Ces différences semblaient normales car le nombre de cellules au sein des différents organes sensoriels de *D. melanogaster* varie selon les types sensoriels : une cellule pour les neurones multidendritiques isolés, deux cellules pour le neurone bipolaire dbd et sa cellule gliale associée, quatre cellules pour les microchètes et certaines scolopidies, cinq cellules pour d'autres scolopidies, six cellules pour les organes sensoriels externes gustatifs poly-innervés de la larve, etc.

Tous ces modèles de lignage - sauf celui des microchètes proposé par l'équipe de Véronica Rodrigues et par le laboratoire - avaient été proposés sur la base d'analyses indirectes: marquage par incorporation de BrdU (Bodmer et al., 1989), analyse de clones de cellules marquées (Brewster et Bodmer, 1995) et analyse de mutants (Brewster et Bodmer, 1995; Vervoort et al., 1997). Pendant ma thèse, de nouvelles observations (dont mes travaux) ont conduit à modifier ces modèles de lignages.

Dans la partie qui va suivre, nous nous intéresserons à deux lignages : le lignage des microchètes du thorax de l'adulte et le lignage des organes sensoriels externes de la larve. Ces deux lignages, tels que nous les voyons aujourd'hui, sont présentés sur la figure 12. Dans chaque lignage, la cellule pIIa produit les cellules soie et socle tandis que la cellule pIIIb donne le neurone et la cellule gaine. Dans le cas des microchètes, la cellule pIIb donne une cellule gliale qui entre en apoptose (Fichelson et Gho, 2003). Par contre, dans le cas des organes sensoriels externes de l'embryon, la cellule pIIb donne un neurone multidendritique (Orgogozo et al., 2001).



Fig. 12 - Deux modèles de lignage. (A) microchètes du thorax adulte, (B) organes sensoriels externes mono-innervés de l'embryon.

Donner deux cellules filles différentes : à nouveau la voie Notch

Les analyses phénotypiques des mutants Notch, des doubles mutants nuls Delta, Serrate et des mutants Delta thermosensibles ont révélé qu'en plus de son rôle dans l'inhibition latérale, la voie Notch contrôle les décisions binaires concernant le devenir des deux cellules filles produites par les cellules précurseurs. Dans ces mutants, les cellules soies et socles sont absentes et des neurones surnuméraires sont observés, indiquant que les cellules pIIa ont été transformées en cellules pIIb (Hartenstein et Campos-Ortega, 1986 ; Hartenstein et Posakony, 1990; Parks et Muskavitch, 1993; Guo et al., 1996; Vervoort et al., 1997; Zeng et al., 1998). Dans le thorax, quatre neurones sont parfois observés et une diminution moins sévère de l'activité Notch peut conduire à l'apparition de deux neurones et deux cellules gaines. Notch est donc impliqué à la fois dans les décisions pIIa/pIIb et les décisions cellule gaine/neurone suite aux divisions des cellules pI et pIIIb respectivement. Dans les embryons mutants Notch nuls, toutes les cellules produites sont des neurones multidendritiques (Vervoort et al., 1997), indiquant des transformations totales pIIa>pIIb et pIIIb>neurone multidendritique. Les clones mutants Notch nuls réalisés dans le thorax présentent une cuticule nue (Heizler et Simpson, 1991), mais la nature des cellules sensorielles sous-jacentes n'a pas été analysée. Par analogie avec le lignage des organes sensoriels externes de la larve, on s'attendrait à observer seulement quelques cellules gliales en apoptose.

À l'inverse, la surexpression d'une forme activée de Notch conduit à quatre cellules socle, indiquant que les deux transformations pIIb>pIIa et cellule soie>cellule socle ont eu lieu (Guo et al., 1996). Il semble donc que Notch contrôle également la décision cellule soie/cellule socle. On ne sait pas si Notch est aussi requis pour spécifier la différence cellule gliale/pIIIb suite à la division de pIIb dans le lignage des microchètes car l'existence de cette division cellulaire a été mise en évidence plus récemment et la fonction de Notch au cours de cette division n'a pas été étudiée (Reddy et Rodrigues, 1999a ; Gho et al., 1999). Dans le lignage des papilles de l'aile, qui est semblable à celui des microchètes (Van de Bor et al., 2000), Notch contrôle la décision cellule gliale/pIIIb (Van de Bor et Giangrande, 2001).

De façon surprenante, les gènes du complexe E(Spl) ne semblent pas jouer de rôle au cours de ce processus. En effet, dans les mutants dépourvus de la totalité du complexe E(Spl), l'inhibition latérale est défectueuse mais les soies surnuméraires présentent un ensemble correct de cellules sensorielles dans les microchètes (Heiztler et al., 1996 ; Nagel et al., 2000). De plus, suite à l'expression ectopique de certains gènes du complexe E(Spl), de nombreuses soies sont perdues mais celles qui restent sont tout à fait normales, et il n'y a jamais de cellules sensorielles sous la cuticule nue (Nagel et al., 2000). Contrairement au cas de l'inhibition latérale, on ne connaît pas les cibles potentielles directes de la voie Notch lors des décisions binaires suite aux divisions des cellules précurseurs.

Ainsi, la voie Notch contrôle deux processus au cours du développement des organes sensoriels : l'inhibition latérale et les décisions binaires du destin des cellules filles. Les cibles de Notch au cours de ces deux processus semblent différentes. Les mécanismes en aval du récepteur Notch restent aujourd'hui relativement mal connus. Par contre, les mécanismes qui restreignent l'activation de la voie Notch à une seule cellule fille suite à la division sont beaucoup mieux connus.

Numb inhibe la voie de signalisation Notch

Le gène *numb* a été découvert à cause de son phénotype de perte de fonction dans l'embryon : dans les mutants *numb*, les organes sensoriels sont localisés correctement mais comprennent quatre cellules socles et pas de neurones (Uemura et al., 1998 ; Rhyu et al., 1994 ; Brewster et Bodmer, 1995 ; Vervoort et al., 1997), indiquant que des transformations pIIb>pIIa et cellule soie>cellule socle ont eu lieu. Des transformations de neurone en cellule gaine peuvent aussi être observées (Rhyu et al., 1994 ; Wang et al., 1997). La surexpression de *numb* entraîne les transformations inverses (Rhyu et al., 1994 ; Wang et al., 1997). Ainsi, *numb* contrôle les trois mêmes décisions binaires que *Notch* mais dans le sens opposé. Le gène *numb* n'est pas impliqué dans le processus d'inhibition latérale. Les analyses épistatiques indiquent que *numb* agit en amont de *Notch* (Guo et al., 1996).

Le gène numb code une protéine à domaine PTB (phosphotyrosine binding domain ; Bork et Margolis, 1995) qui est présente de façon uniforme au cortex de toutes les cellules de l'épithélium. Au cours de toutes les divisions cellulaires des cellules précurseurs analysées jusqu'à présent, Numb est localisée à un pôle de la cellule et est reçue par une seule des deux cellules filles (Rhyu et al., 1994; Knoblich et al., 1995; Wang et al., 1997; Reddy et Rodrigues, 1999a; Gho et al., 1999). Dans la cellule fille qui recoit Numb, la voie Notch est inactivée. Mais par quel mécanisme ? Des expériences d'interactions in vitro et de doublehybride montrent que Numb se lie directement au domaine intracellulaire de Notch (Guo et al., 1996). De plus, Numb est capable de se lier à l' α -Adaptine, une protéine qui facilite l'endocytose des récepteurs transmembranaires (Santolini et al., 2000 ; Berdnik et al., 2002). Au cours de la division, les molécules d' α -Adaptine sont plus concentrées au pôle où se trouve Numb (Berdnik et al., 2002). Les analyses épistatiques placent α -Adaptine en aval de *numb* mais en amont de *Notch*, suggérant que Numb inhibe Notch grâce à l' α -Adaptine. Sur la base de ces observations, le modèle simple suivant a été proposé (Berdnik et al., 2002) : la division de la cellule précurseur donne une cellule fille contenant l'inhibiteur Numb et une cellule fille dépourvue de Numb. Les ligands Delta et Serrate, qui agissent de façon redondante (Zeng et al., 1998), sont présents à la surface des deux cellules et peuvent activer la voie Notch dans les deux cellules filles. Dans la cellule qui a reçu Numb, Numb se fixe alors au récepteur Notch et recrute l'a-Adaptine, ce qui entraîne la dégradation de Notch par la voie endocytique. La voie Notch est ainsi inhibée dans la cellule qui a recu Numb.

Des homologues de *numb* ont été identifiés chez les Vertébrés (résumé dans Cayouete et Raff, 2002). Ces gènes ont été très bien conservés au cours de l'évolution. En effet, le gène *numb* de souris peut sauver le phénotype des mutants *numb* chez *D. melanogaster* (Zhong et al., 1996 ; Verdi et al., 1996). Chez la souris, Numb est localisé au cortex apical des cellules neuroépithéliales (Zhong et al., 1996 ; Cayouette et al., 2001). Par contre, de façon surprenante, l'homologue chez le poulet est localisé au pôle basal (Wakamatsu et al., 1999). Ainsi, des divisions perpendiculaires au plan du neuroépithélium pourraient conduire à la formation de deux cellules filles différentes : une qui reçoit Numb et l'autre non. Cette idée est encore largement controversée aujourd'hui. Cependant, la localisation asymétrique de Numb a été détectée dans plusieurs tissus chez la souris (Zhong et al., 1996), le poulet

(Wakamatsu et al., 1999 ; Wakamatsu et al., 2000) et le rat (Cayouette et al., 2001). Mais c'est l'observation de cellules isolées en culture qui a fourni la meilleure démonstration que Numb contrôle probablement la production de deux cellules différentes chez les Vertébrés (Shen et al., 2002). Parmi les deux cellules filles issues d'une division asymétrique, celle qui est Numb-positive se différencie préférentiellement en neurone alors que sa cellule sœur Numb-négative reste une cellule neuroépithéliale. Dans d'autres cas, les deux cellules filles se différencient en neurones mais celle qui a reçu Numb produit de plus longs dendrites. Ces corrélations suggèrent que Numb contrôle également les décisions binaires concernant le devenir des deux cellules filles produites par une division asymétrique chez les Vertébrés.

Un autre modulateur de la voie Notch!: Neuralized

Numb est aussi localisé et reçu asymétriquement au cours des divisions des neuroblastes chez *D. melanogaster*. Pourtant, dans les mutants nuls pour *numb*, la plupart des divisions des neuroblastes sont toujours asymétriques (Uemura et al.,1989 ; Rhyu et al., 1994 ; Spana et al., 1995a) et les transformations des cellules précurseurs sensorielles ne touchent pas la totalité des organes (Uemura et al.,1989 ; Rhyu et al., 1994). Une explication est que la composante maternelle de *numb* est suffisante pour conférer une asymétrie (Uemura et al., 1989). En effet, les protéines et l'ARNm de Numb déposés par les gènes de la mère sont détectés dans l'embryon (Uemura et al., 1989). Une autre possibilité est que d'autres molécules contrôlent l'activité de la voie Notch au cours des divisions asymétriques.

La protéine ubiquitine-ligase E3 Neuralized est un excellent candidat pour ce rôle, bien que sa fonction n'ait pas été étudiée au cours des divisions des neuroblastes et des cellules précurseurs sensorielles de l'embryon. Au cours de la division de la cellule pI des microchètes, Neuralized se localise au même pôle que Numb et est reçue par la cellule fille qui envoie le signal Notch (Le Borgne et Schweisguth, 2003a). Les mutants *neuralized* ont un phénotype semblable aux mutants *Notch* : de nombreuses cellules pI sont produites les unes à côté des autres et les cellules pIIa sont transformées en pIIb (Yeh et al., 2000 ; Lai et Rubin, 2001 ; Le Borgne et Schweisguth, 2003a). De nombreuses expériences indiquent que Neuralized favorise l'endocytose des ligands Delta dans les cellules qui envoient le signal Notch, ce qui active la voie Notch dans les cellules voisines par un mécanisme encore inconnu (Deblandre et al., 2001 ; Lai et Rubin., 2001 ; Pavlopoulos et al., 2001 ; Yeh et al., 2003b). En effet, la cellule fille qui reçoit Neuralized accumule une plus grande quantité de Delta dans le compartiment endosomal que sa cellule fille (Le Borgne et Schweisguth, 2003a).

Numb et Neuralized semblent agir de façon indépendante pour restreindre l'activité de Notch à une seule cellule fille suite à la division de la cellule pI. En effet, dans les mutants *neuralized*, Numb est reçu correctement par une seule cellule fille mais l'endocytose de Delta a lieu de façon identique dans les deux cellules filles, contrairement aux sauvages (Le Borgne et Schweisguth, 2003a). À l'inverse, dans les mutants *numb*, la localisation asymétrique de Neuralized est correcte et la cellule qui reçoit Neuralized accumule une plus grande quantité de Delta dans le compartiment endosomal que sa cellule sœur. Cette asymétrie résiduelle

pourrait donc suffire dans certaines microchètes pour spécifier deux cellules filles différentes dans les mutants *numb*.

L'analyse de clones mutants *neuralized* indique que *neuralized* est aussi impliqué dans la décision celule soie/cellule socle suite à la division de la cellule pIIa (Le Borgne et Schweisguth, 2003a). Il reste à déterminer si Neuralized joue également un rôle majeur au cours des autres divisions asymétriques chez *D. melanogaster*.

Prospero!: un autre déterminant d'identité cellulaire!?

Prospero est un facteur de transcription à homéodomaine qui est également localisé asymétriquement au cours des divisions des neuroblastes (Doe et al., 1991 ; Vaessin et al., 1991 ; Hirata et al., 1995 ; Knöblich et al., 1995 ; Spana et Doe, 1995). Contrairement à Numb, qui est présent et localisé asymétriquement dans toutes les cellules en division du lignage des microchètes, Prospero est détecté uniquement dans les cellules pIIb et pIIIb, où il est présent à un pôle de la cellule en division (Reddy et Rodrigues, 1999b ; Manning et Doe, 1999 ; Gho et al., 1999 ; Reddy et Rodrigues, 1999a).

Dans les mutants prospero, les transformations sont très rares : plus de 95% des microchètes du thorax ont le complément correct de cellules sensorielles et dans le reste des cas, des doubles soies associées à des doubles socles sont observées, suggérant que la cellule pIIb a été transformée en cellule pIIa (Manning et Doe, 1999 ; Reddy et Rodrigues, 1999b ; Fichelson et Gho, 2002). Ce phénotype très faible est en accord avec les analyses précédentes des embryons mutants prospero qui n'ont pas mis en évidence de défauts dans le SNP de la larve (Doe et al., 1991 ; Vaessin et al., 1991). Toutefois, il a été remarqué que dans les mutants prospero, le neurone sensoriel des microchètes n'est pas marqué avec l'anticorps anti-HRP, qui reconnaît des glycoprotéines particulières présentes à la surface de tous neurones sauvages de l'embryon (Manning et Doe, 1999 ; Jan et Jan, 1982). De plus, les neurones du SNP de la larve présentent des défauts de croissance et de trajectoire (Doe et al., 1991 ; Vaessin et al., 1991). Un des rôles principal de Prospero serait donc de participer à la différenciation du neurone. À ce propos, il est intéressant de remarquer que lors de la division de pIIIb qui produit le neurone, Prospero est reçu par le futur neurone. Ensuite, Prospero disparaît du neurone et commence alors à s'accumuler en grande quantité dans la cellule sœur du neurone, la cellule gaine (Reddy et Rodrigues, 1999a ; Gho et al., 1999). L'effet de prospero sur la différenciation du neurone peut donc être cellulaire autonome (prospero est requis dans la cellule mère du neurone) ou cellulaire non-autonome (prospero est requis dans la cellule gaine qui envoie alors un signal au neurone).

La surexpression de *prospero* dans la cellule pI entraîne des défauts beaucoup plus importants que sa perte de fonction. Dans tous les cas, aucune cellule soie ou socle n'apparaît et des groupes de un ou deux neurones associé(s) à une ou deux cellules gaines sont observés (Manning et Doe, 1999 ; Reddy et Rodrigues, 1999b). Ces résultats indiquent que *prospero* est capable d'empêcher la cellule pIIa de se développer normalement et de la transformer en cellule pIIb.

L'accumulation de Prospero uniquement dans la branche pIIb du lignage semble donc contrôler la différence entre la branche pIIa et la branche pIIb. Cette différence n'est pas due à

la ségrégation asymétrique de Prospero au cours de la division de la cellule pI mais à l'activation de la transcription du gène *prospero* spécifiquement dans la cellule pIIb. Dans les cellules filles de pI, l'expression de *prospero* est restreinte à la cellule pIIb par la machinerie Notch/Numb (Reddy et Rodrigues, 1999b).

La machinerie de localisation asymétrique des déterminants au cours de la division du neuroblaste

Pour que des déterminants d'identité soient reçus asymétriquement par une seule des cellules filles, il faut tout d'abord qu'ils se localisent à un pôle de la cellule, puis que le fuseau mitotique s'oriente de telle sorte qu'ils soient reçus par une seule des deux cellules filles. La division des neuroblastes est le modèle le plus étudié et le mieux connu de division asymétrique chez *D. melanogaster*. Les neuroblastes se divisent de façon répétée perpendiculairement au plan de l'épithélium, selon l'axe apico-basal. Ils produisent une série de petites cellules, les cellules mères des ganglions (CMG), qui se divisions des neuroblastes, Numb, Prospero et l'ARNm de *prospero* s'accumulent au pôle basal du neuroblaste et sont reçus par la CMG (Vaessin et al., 1991 ; Doe et al., 1991 ; Knöblich et Jan, 1995 ; Hirata et al., 1997 ; Fig. 13).

La polarité apico-basale des neuroblastes est issue de la polarité de l'épithélium dont ils proviennent. Cette polarité est mise en place très tôt au cours de l'embryogenèse, au stade blastoderme cellulaire (résumé dans Müller et al., 2000). Dans toutes les cellules épithéliales, un complexe de protéines comprenant les protéines à domaine PDZ Par-6 et Bazooka (homologue de la protéine Par3 de *C. elegans* et des Mammifères) ainsi que la protéine kinase atypique DaPKC est localisé dans la région apicale. Quand le neuroblaste délamine de l'épithélium, le complexe Bazooka-Par-6-DaPKC est ainsi localisé dans le pédoncule apical (Kuchinke et al., 1998 ; Schober et al., 1999 ; Wodarz et al., 1999 ; Wodarz et al., 2000). Il recrute alors les protéines Inscuteable, Partner of Inscuteable (Pins) et la petite sous-unité α $G_{\alpha i}$ des protéines G hétérotrimériques puis la division a lieu perpendiculairement au plan de l'épithélium (Kraut et Campos-Ortega, 1996 ; Kraut et al., 1996 ; Schober et al., 1999 ; Wodarz et al., 1999 ; Yu et al., 2000 ; Schaeffer et al., 2000 ; Parmentier et al., 2000 ; Schaeffer et al., 2001). Une mutation perte de fonction dans l'un des six gènes du complexe apical entraîne un phénotype similaire : les déterminants Numb et Prospero sont mal localisés et l'orientation du fuseau est aléatoire (références précédentes et Kaltschmidt et al., 2000).

La localisation au pôle basal des déterminants Numb et Prospero dépend également de protéines adaptatrices : la protéine Partner of Numb (Pon) pour Numb (Lu et al., 1998) et la protéine Miranda pour Prospero (Ikeshima-Kataoka et al., 1997 ; Schuldt et al., 1998 ; Shen et al., 1997). Ces molécules adaptatrices sont aussi localisées au pôle basal du neuroblaste au cours de la division, sous le contrôle du complexe apical Bazooka-Par-6-DaPKC-Insc-Pins- $G_{\alpha i}$.

En prophase et en métaphase, la fonction du complexe apical est très importante car l'absence d'un de ses constituants conduit à la localisation uniforme des protéines basales. Par contre, en télophase, les protéines sont toujours correctement concentrées au pôle basal puis



Fig. 13 - Localisation asymétrique de certaines molécules au cours des divisions des neuroblastes et des cellules précurseurs des organes sensoriels. Lgl: lethal giant larvae, Baz: Bazooka, Dlg: Discs large, Mira: Miranda, Pros: Prospero, Cad: Cadhérine. D'après Le Borgne et al., 2002.

sont bien reçues par la CMG même si un membre du complexe apical est absent (Schober et al., 1999 ; Wodarz et al., 1999 ; Kaltschmidt et al., 2000). Ce phénomène a été appelé « sauvetage en télophase » (Peng et al., 2000 ; Cai et al., 2001). Aucun des composants du complexe apical ne semble requis pour le « sauvetage en télophase ». Cette étape met en jeu trois autres gènes de la famille *snail*, appelés *snail*, *worniu* et *escargot*, qui codent des facteurs de transcription à doigts de zinc et qui agissent de façon redondante (Cai et al., 2001 ; Ashraf et al., 2001). Dans les triples mutants, le « sauvetage en télophase » n'a pas lieu et l'expression du gène *inscuteable* est plus faible. Contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, l'expression ectopique du gène *inscuteable* dans les triples mutants du complexe apical, la fonction des gènes *snail*, *worniu* et *escargot* et le mécanisme de « sauvetage en télophase » ne sont pas requis. Le « sauvetage en télophase » est donc un mécanisme redondant qui permet de localiser correctement les déterminants d'identité cellulaire au cours de la télophase en cas de défaillance du complexe apical.

Les gènes suppresseurs de tumeur *discs large* (*dlg*) et *lethal giant larvae* (*lgl*) sont également requis pour la localisation des protéines basales, mais pas pour celle des protéines du complexe apical (Ohshiro et al., 2000 ; Peng et al., 2000). La protéine kinase du complexe apical DaPKC est capable de phosphoryler la protéine Lgl, ce qui détache Lgl du cytosquelette d'actine et de la membrane (Betschinger et al., 2003). Comme Lgl est requis pour la localisation de Miranda au cortex de la cellule (Ohshiro et al., 2000 ; Peng et al., 2000), cette phosphorylation de Lgl au pôle apical empêcherait la localisation de Miranda à ce pôle (Betschinger et al., 2003).

Une des caractéristiques de la division du neuroblaste est la production de deux cellules filles de tailles différentes : une petite CMG basale et un gros neuroblaste apical. L'asymétrie du fuseau mitotique en anaphase, qui est plus court du côté de la CMG, ainsi que l'attraction du fuseau vers la future CMG sont responsables de cette différence de taille (Kaltschmidt et al., 2000 ; Giansanti et al., 2001). Il semble que les complexes Bazooka-Par-6-DaPKC et Insc-Pins-G_{ai} contrôlent en parallèle cette asymétrie en envoyant tous deux un signal d'élongation du fuseau dans la région où ils sont localisés (Cai et al., 2003).

Contrairement aux neuroblastes, les cellules épithéliales se divisent dans le plan de l'épithélium. Dans les cellules épithéliales, le complexe Bazooka-Par-6-DaPKC est localisé au pôle apical comme dans les neuroblastes alors que les protéines Pins et $G_{\alpha i}$ sont basolatérales (Kuchinke et al., 1998 ; Schaeffer et al., 2000 ; Yu et al., 2000 ; Wodarz et al., 2000 ; Schaeffer et al., 2001). Le gène *inscuteable* n'est pas exprimé dans les cellules épithéliales (Kraut et al., 1996). Son expression ectopique dans l'épithélium conduit au recrutement de Insc-Pins- $G_{\alpha i}$ au pôle apical et à la réorientation du fuseau selon l'axe apicobasal (Kraut et al., 1996 ; Knoblich et al., 1998 ; Schaeffer et al., 2000 ; Yu et al., 2000 ; Schaeffer et al., 2001). La différence principale entre l'épithélium et les neuroblastes semble donc être la présence ou absence de la protéine Inscuteable. Cependant, deux observations suggèrent qu'au moins un autre facteur est responsable de la différence de polarité entre les neuroblastes et les cellules épithéliales. Premièrement, quand les jonctions adhérentes des cellules épithéliales sont rompues, les cellules épithéliales se divisent asymétriquement selon l'axe apico-

asymétriquement selon axe apico-basal en absence d'Inscuteable selon un mécanisme indépendant du gène *inscuteable* (Rath et al., 2002).

La division de pIIb ressemble à celle du neuroblaste

Au cours du lignage des microchètes, les cellules pI et pIIa se divisent dans le plan de l'épithélium alors que les divisions des cellules pIIb et pIIIb ont lieu selon l'axe apico-basal (Gho et Schweisguth, 1998 ; Gho et al., 1999 ; Roegiers et al., 2001a ; Bellaïche et al., 2001). La division de la cellule pIIb ressemble énormément à celle du neuroblaste : elle produit également une cellule basale de petite taille et une cellule apicale plus grosse (Gho et al., 1999 ; Reddy et Rodrigues, 1999a). De plus, toutes les molécules localisées asymétriquement dans le neuroblaste qui ont été analysées jusqu'à présent sont localisées de la même manière dans la cellule pIIb (Gho et al., 1998 ; Gho et al., 1999 ; Reddy et Rodrigues, 1999a ; Roegiers et al., 2001a ; Le Borgne et al., 2002 ; Fig. 13). Il est donc probable que la polarité de la division de pIIb soit contrôlée par les mêmes mécanismes que les neuroblastes. En effet, Inscuteable, qui est localisé au pôle apical de la cellule pIIb, contrôle l'asymétrie de cette division (Roegiers et al., 2001a).

La division de pl!: un équilibre entre deux complexes antérieur et postérieur

Comme la division de la cellule pI a lieu dans le plan de l'épithélium, elle doit être contrôlée par des mécanismes différents. En effet, Inscuteable n'est pas détecté dans la cellule pI (Gho et Schweisguth., 1998 ; Gho et al., 1999 ; Bellaïche et al., 2001). Contrairement aux neuroblastes où les complexes Bazooka-Par-6-DaPKC et Insc-Pins- $G_{\alpha i}$ sont localisés au même pôle, Pins- $G_{\alpha i}$ est présent au cortex antérieur avec Numb alors que Bazooka-DaPKC (et probablement Par-6) est au pôle postérieur (Bellaïche et al., 2001 ; Schaeffer et al., 2001 ; Schoeber et al., 2001 ; Cai et al., 2003 ; Fig. 13). Ces deux complexes s'excluent mutuellement, entraînant leur localisation à deux pôles opposés de la cellule. Par contre, Inscuteable, s'il est produit ectopiquement dans la cellule pI, est capable de regrouper les deux complexes au pôle antérieur (Bellaïche et al., 2001). Au cours de la division dans le sauvage, Numb et Pon sont reçus par la cellule antérieure (Gho et al., 1999 ; Bellaïche et al., 2001) mais si *inscuteable* est exprimé dans la cellule pI, Numb et Pon sont reçus par la cellule pI, Numb et Pon sont reçus par la cellule postérieure. Dans toutes les situations examinées, Numb est donc toujours localisé au pôle opposé de Bazooka, suggérant que Bazooka-Par-6-DaPKC est le complexe protéique qui détermine la position de Numb.

Contrairement aux divisions des neuroblastes, Dlg est localisé sur tout le cortex de la cellule pI en division, avec une accumulation plus forte au pôle antérieur (Bellaïche et al., 2001). Lgl est localisé comme dans les neuroblastes sur tout le cortex de la cellule pI en division mais il n'est pas requis lors de cette division (Justice et al., 2003). Alors que le gène *dlg* est requis pour localiser asymétriquement le déterminant Numb lors de la division de la cellule pI, *lgl* n'est pas requis (Bellaïche et al., 2001 ; Justice et al., 2003).

La division de la cellule pI a lieu dans le plan de l'épithélium et selon un axe particulier (l'axe antéro-postérieur de l'animal). On dit que cette division suit une **polarité**

planaire. L'orientation de cette division est sous le contrôle d'un groupe de gènes comprenant *frizzled*, *dishevelled* et *flamingo* (Gho et Schweisguth, 1998 ; Lu et al., 1999 ; Roegiers et al., 2001a ; Bellaïche et al., 2001), qui contrôlent également la polarité planaire de nombreux autres tissus tels que l'œil ou l'aile (résumé dans Shulman et al., 1998 et dans Adler et al., 2002). Dans ces mutants, les déterminants et les protéines du complexe apical sont toujours bien localisés asymétriquement mais avec une orientation aléatoire. De façon remarquable, le fuseau mitotique s'oriente dans la plupart des cas de telle sorte que les déterminants sont toujours reçus par une seule des deux cellules filles. Ces observations indiquent donc que les gènes de polarité planaire ne sont pas requis pour établir l'asymétrie mais pour orienter la division selon l'axe antéro-postérieur.

Les microchètes du thorax présentent aussi une polarité planaire : elles sont toutes dirigées vers la région postérieure de l'animal. Dans les mutants de polarité planaire, elles sont aussi orientées de façon plus ou moins aléatoire (résumé dans Adler et al., 2002). Cependant, il n'y a pas de corrélation entre l'orientation de la division de pI et celle de la soie (Lu et al., 1999). D'autres mécanismes doivent donc contrôler la mise en place de la polarité des soies.

L'orientation de la division de plla est déterminée par celle de pl

Chez les animaux et les levures, il a été observé que l'orientation de la future division cellulaire est parfois déterminée par celle de la division précédente (résumé dans Goldstein, 2000). La mitose de la cellule pIIa en est un exemple. En effet, pIIa se divise toujours avec la même orientation que sa cellule mère pI, même si celle-ci est aléatoire comme dans les mutants *frizzled* (Gho et Schweisguth, 1998 ; Bellaïche et al., 2001). Avant la division, des molécules de Cadhérine et Caténine s'accumulent au point de contact entre pIIa et sa cellule sœur pIIb (Le Borgne et al., 2002 ; Fig. 13). Ils sont requis pour orienter correctement la division.

Chez *D. melanogaster,* de nombreux autres tissus sont formés grâce au même mode de développement

La formation des organes sensoriels de *D. melanogaster* fait partie des modèles de développement les mieux connus (la segmentation antéro-postérieure de l'embryon de *D. melanogaster* ou la formation de la vulve chez *C. elegans* sont deux autres systèmes également très bien connus). C'est pourquoi de nombreuses comparaisons ont été effectuées entre la formation des organes sensoriels chez *D. melanogaster* et le développement d'autres tissus. Ces comparaisons révèlent que les mécanismes détaillés plus haut sont aussi employés pour former un nombre incroyable de tissus différents chez *D. melanogaster*.

Les neurones et les cellules gliales du SNC sont formés de la même manière que le SNP, suite aux divisions asymétriques d'un neuroblaste spécifié au sein d'un groupe proneural (Tableau 3).

	gènes proneuraux	inhibition latérale grâce à la voie	division asymmétrique	références
SNC	Oui achaete, scute, lethal of scut	oui	oui numb, insc, etc.	voir introduction
SN entérique	oui achaete, scute, lethal of scute	oui	?	Gonzales-Gaitan et Jäcke, 1995
muscles	oui lethal of scute	oui	oui numb, insc	Carmena et al., 1995 Ruiz Gomez et Bate, 1997 Carmena et al., 1998
cellules péricardiaques	oui lethal of scute	oui	oui numb, insc	Carmena et al., 1995 Carmena et al., 1998 Ward et Skeath, 2000
cellules cardiaques	?	?	oui numb	Ward et Skeath, 2000
cellule de l'extrémité du tube de Malpighi	oui achaete, scute, lethal of scute	oui	oui numb, insc	Hoch et al., 1995 Wan et al., 2000
intestin	oui scute, lethal of scute	oui	oui Pros, Insc	Tepass et Hartenstein, 1995 Spana et Doe, 1995 Kraut et al., 1996

Tableau 3 – Liste des tissus qui utilisent le même mode de développement que celui des organes sensoriels chez *D. melanogaster*.



Fig. 14 - Les étapes successives de formation des muscles chez *D. melanogaster.* Les cellules bleues accumulent le facteur de transcription Twist. Le domaine d'expression de *lethal of scute* est en violet. Voir texte pour les détails. D'après Baylies et al., 1998.

L'exemple le plus surprenant d'organe formé par les mêmes mécanismes moléculaires est sûrement celui des muscles (résumé dans Baylies et al., 1998 ; Fig. 14). Tout d'abord, un groupe de cellules se met à exprimer le gène proneural *lethal of scute* (Carmena et al., 1995). Ensuite, l'expression de *lethal of scute* se restreint à une seule cellule par inhibition latérale grâce à la voie Notch. La cellule spécifiée devient alors la cellule précurseur des futures

cellules musculaires fondatrices. Elle subit une division asymétrique, au cours de laquelle Numb est reçu par une seule des deux cellules filles (Ruiz-Gomez et Bate, 1997 ; Carmena et al., 1998). Comme pour les organes sensoriels, Numb agit en inhibant la voie Notch dans une des deux cellules filles. De plus, ces divisions sont contrôlées par *inscuteable* (Ruiz-Gomez et Bate, 1997 ; Carmena et al., 1998). Enfin, à l'image de Cut et Pox-neuro, certains facteurs de transcription, comme Krüppel, sont exprimés dans un sous-ensemble de cellules précurseurs et spécifient une identité musculaire particulière (Ruiz-Gomez et al., 1997). Les cellules musculaires fondatrices ainsi formées fusionnent avec des cellules voisines pour donner des fibres musculaires syncitiales.

D'autres tissus sont également formés à partir de la même séquence d'événements (Tableau 3). Les tubules de Malpighi sont des longs tubes invaginés du tube digestif postérieur. Ils permettent l'excrétion des déchets azotés et le contrôle de l'équilibre osmotique du milieu intérieur chez tous les Insectes. Au cours du développement, quatre protubérances se forment par invagination du tube digestif et forment de longs tubes qui s'allongent. Au moment où les tubules se forment, une cellule apparaît à l'extrémité de chaque invagination. Cette cellule accumule une grande quantité des gènes proneuraux du complexe achaete-scute et est appelée « tip cell ». Elle est formée exactement de la même manière que les cellules sensorielles. Tout d'abord, un groupe de cellules se met à exprimer achaete, scute et lethal of scute (Hoch et al., 1994), puis par inhibition latérale via Notch, une seule cellule du groupe se différencie en cellule précurseur de la « tip cell » (Hoch et al., 1994). Cette cellule se divise asymétriquement une fois. Numb est reçu par une seule des deux cellules filles, qui se différencie en « tip cell » (Wan et al., 2000). La cellule sœur de la « tip cell » perd l'expression des gènes proneuraux (Hoch et al., 1994) et entre en apoptose (Helen Skaer, communication personnelle). Au cours du développement des tubules de Malpighi, la « tip cell » et sa cellule précurseur produisent un signal Spitz/EGF qui active la prolifération cellulaire à l'extrémité du tubule en formation (Sudarsan et al., 2002).

Le système nerveux entérique de la larve est constitué de neurones endocrines groupés entre les deux hémisphères cérébraux et innervant différentes parties du tube digestif (résumé dans Hartenstein, 1997). Ils contrôlent probablement la prise de nourriture et le transport des aliments le long du tube digestif. Au cours de l'embryogenèse, le système nerveux entérique est issu de trois invaginations de l'épithélium ventral de la tête (Fig. 15). Avant l'invagination, des groupes de cellules se mettent à exprimer les gènes proneuraux achaete, scute et lethal of scute (Hartenstein et al., 1994; Gonzales-Gaitan et Jacle, 1995, Hartenstein et al., 1995). Puis par inhibition latérale via Notch, trois cellules isolées exprimant un fort niveau d'achaete sont spécifiées (Gonzales-Gaitan et Jacle, 1995 ; Hartenstein et al., 1996). Elles délaminent alors de l'épithélium, comme les neuroblastes, et se mettent à produire un signal Spitz/EGF (Gonzales-Gaitan et Jacle, 2000). Ce signal entraîne localement l'invagination des cellules voisines et trois poches se forment. Au cours de l'invagination, une nouvelle cellule délamine à l'extrémité de chaque poche (Hartenstein et al., 1996). Chaque poche donne naissance à une vésicule dans laquelle les cellules épithéliales conservent leurs caractéristiques épithéliales pendant un certain temps. Ensuite, les vésicules se dissocient en cellules individuelles et se différencient toutes en neurones. Des expériences d'injection de traceurs marqués indiquent que les cellules qui s'invaginent (dont probablement les cellules



Fig. 15 - Les étapes successives de la formation du système nerveux entérique chez *D. melanogaster.* D'après Hartenstein et al., 1996.

qui produisent le signal Spitz) se divisent une ou deux fois au cours de ce processus (Copenhaver et Taghert, 1990 ; Copenhaver et Taghert, 1991 ; Hartenstein et al., 1994). On ne sait pas si ces divisions sont asymétriques et si elles sont aussi reproductibles que les divisions cellulaires des lignages sensoriels (Hartenstein, 1997). Toutefois, la différence principale par rapport au SNC et au SNP est que les neurones ne proviennent pas de neuroblastes isolés qui ont délaminé, mais de la totalité d'un épithélium invaginé. Ce mode de développement ressemble étrangement à la formation du SNC et du SNP chez les Vertébrés.

Les cellules péricardiaques et cardiaques proviennent également de divisions asymétriques au cours desquelles Numb est reçue par une seule des deux cellules filles (Carmena et al., 1995 ; Ward et Skeath, 2000). Certaines cellules péricardiaques sont les cellules filles de cellules musculaires fondatrices. De même, au cours des divisions des cellules précurseurs de l'intestin moyen adulte, Prospero et Inscuteable sont localisés asymétriquement (Spana et Doe, 1995 ; Kraut et al., 1996).

Enfin, Inscuteable a aussi été détecté dans les branches des trachées, le pharynx et certaines cellules folliculaires de l'oocyte (Kraut et al., 1996), ce qui suggère que ces tissus pourraient également être formés grâce aux mêmes mécanismes. De même, chez les Vertébrés, la formation du tube digestif met en jeu les gènes proneuraux (intestin ; Yang et al., 2001) et des divisions asymétriques (œsophage ; Seery et Watt, 2000).

Toutes ces observations illustrent bien que les mêmes molécules sont utilisées de façon répétée et dans plusieurs endroits du corps au cours du développement. Mais comment un même processus de développement peut-il engendrer des organes aussi différents ? Là encore, on pense que des combinaisons différentes de molécules conduisent à la formation d'organes différents. Par exemple, les facteurs de transcription Huckebein et Forkhead s'accumulent spécifiquement dans la région présomptive du système nerveux entérique et sont requis pour son développement (résumé dans Hartenstein, 1997).

Conclusion, mes projets et résultats

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des organes sensoriels sont relativement bien connus et contrôlent le développement d'une extraordinaire variété de tissus au sein des animaux. Lors de la formation de tous les organes sensoriels de *D. melanogaster*, un groupe de cellules se met à exprimer un gène proneural puis, par inhibition latérale, une seule cellule devient la cellule précurseur pI. Cette cellule subit alors des divisions asymétriques et produit les différentes cellules sensorielles de l'organe.

Quand j'ai commencé mon DEA, les divisions successives du lignage des microchètes du thorax avaient été observées directement et étaient relativement bien connues (Reddy et Rodrigues, 1999a ; Gho et al., 1999). Par contre, pour les autres organes sensoriels de *D. melanogaster*, la succession de toutes les divisions n'avait jamais été observée. Seules des analyses indirectes indiquaient que les lignages semblaient très différents selon les types d'organes sensoriels (Bodmer et al., 1989 ; Brewster et Boder, 1995 ; Vervoort et al., 1997 ; Fig. 11). Rien que pour les organes sensoriels externes de l'embryon composés de quatre cellules, trois lignages différents avaient été proposés (Bodmer et al., 1989 ; Brewster et Boder, 1995 ; Vervoort et al., 1997) !

Projet 1!: le lignage des organes sensoriels externes de l'embryon

Mon projet de DEA était de décrire le lignage de ces organes sensoriels externes, composés de quatre cellules (soie, socle, gaine, neurone) comme les microchètes du thorax. Je devais utiliser les mêmes méthodes que celles qui avaient été utilisées au laboratoire pour décrire le lignage des microchètes : observation de tissus fixés à différents stades du développement, et observation en temps réel sur tissu vivant à l'aide d'une GFP exprimée spécifiquement dans les cellules du lignage (Gho et al., 1999). L'idée sous-jacente était de pouvoir ensuite utiliser le développement des organes sensoriels de l'embryon comme nouveau modèle d'étude de la polarité des divisions asymétriques. En effet, le modèle embryon présente de nombreux avantages par rapport au modèle adulte. Notamment, pour analyser le phénotype de mutants létaux embryonnaires (comme la plupart des mutants qui affectent la polarité des divisions), le modèle adulte nécessite la réalisation de clones mutants alors que le modèle embryon permet d'analyser directement des embryons mutants homozygotes produits par des parents hétérozygotes.

À partir d'embryons fixés à différents stades et marqués pour l'anticorps anti-Cut, qui reconnaît spécifiquement les cellules pI et leur descendance (Blochlinger et al., 1988 ; Blochlinger et al., 1990 ; Blochlinger et al., 1994), Yohanns et moi avons pu analyser petit à petit les divisions successives du lignage de cinq organes sensoriels externes de la région abdominale ventrale. Nous avons observé exactement la même séquence de divisions que pour les microchètes, produisant les quatre cellules de l'organe et une cinquième cellule. Mais contrairement à ce que nous attendions, nous avons remarqué que cette cinquième cellule ne se différencie pas en cellule gliale mais en neurone multidendritique. En fait, cette observation est bien en accord avec les analyses précédentes, qui indiquent que des neurones multidendritiques sont liés par lignage aux organes sensoriels externes de l'embryon

(Brewster et Bodmer, 1995 ; Vervoort et al., 1997). Le modèle de lignage que nous avons ainsi établi est différent des trois qui avaient été proposés auparavant. Contrairement aux autres modèles, le nôtre permet d'expliquer toutes les observations précédentes concernant la formation des organes sensoriels externes dans l'embryon (Orgogozo et al., 2001). Malheureusement, nous n'avons pas pu examiner directement la séquence des divisions sur tissu vivant car nous n'avons pas trouvé de promoteur approprié restreint aux cellules pI de l'embryon. Les promoteurs utilisés pour les microchètes du thorax ne sont pas assez spécifiques dans l'embryon.

Notre description des divisions successives et des différentes cellules du lignage permet maintenant d'examiner la localisation de certaines protéines au cours du lignage et d'analyser le phénotype de certains mutants (Moore et al., 2002 ; Dubruille et al., 2002). De plus, cette description permet d'étudier les mécanismes qui contrôlent la polarité de chacune des divisions cellulaires dans le lignage sensoriel de l'embryon (Orgogozo et al., 2001). Finalement, je n'ai pas continué l'étude de la polarité car des découvertes fortuites m'ont conduite à analyser d'autres processus au cours de la formation des organes sensoriels : l'apoptose et la migration cellulaire.

Projet 2!: apoptose dans les lignages sensoriels

Certains neurones multidendritiques de l'embryon ne sont pas associés à un organe sensoriel externe. Leur origine doit donc être différente. En particulier, le neurone vmd1a (voir annexe) n'est associé à aucun organe sensoriel externe. Nos observations précédentes indiquaient qu'il dérive de la division asymétrique d'une cellule précurseur Cut-positive (Fig. 2C dans Orgogozo et al., 2001). Mais son lignage restait inconnu car avec le marquage Cut, on perd la trace de sa cellule fille après la division. De plus, avant la division, deux cellules Cut-positives étaient parfois observées dans la région (Fig. 2B dans Orgogozo et al., 2001).

L'origine du neurone vmd1a est restée mystérieuse jusqu'à ce que je fasse par hasard une découverte importante. En examinant des embryons portant le gène rapporteur cut-lacZ pour mon projet sur la polarité, j'ai observé sur des fragments de cytoplasme de cellules qui expriment cut dans la région du futur neurone vmd1a. Ces fragments ressemblaient étrangement à des fragments de cellule en apoptose. Tout s'éclairait donc. Les autres cellules produites par le lignage du neurone vmd1a mouraient probablement par apoptose. Il apparaissait même vraisemblable que le lignage de vmd1a ressemble au lignage que nous venions de décrire, la seule différence étant que les cellules pIIa et pIIIb meurent par apoptose. Après l'euphorie de la première semaine, où je cherchais les marqueurs de cellules apoptotiques à utiliser pour tester mon hypothèse (marquage TUNEL, gènes pro-apoptotiques reaper, hid et grim...), je me suis rendue compte qu'il y avait une meilleure expérience à faire : regarder les cellules formées par le lignage de vmd1a en absence d'apoptose. En effet, si mon modèle était vrai, un nouvel organe sensoriel externe devait se former à côté du neurone vmd1a dans ces conditions. François ne pensait pas que le lignage de vmd1a pouvait être aussi semblable au lignage précédent, et nous avons tous été très surpris et heureux de voir qu'effectivement, un nouvel organe sensoriel externe tout à fait normal apparaît en absence d'apoptose !

Le lignage de vmd1a (appelé lignage md-solo) est donc identique au lignage précédent (appelé md-es), sauf que les cellules pIIa et pIIIb entrent en apoptose (Orgogozo et al., 2002). C'était la première fois chez *D. melanogaster* qu'on décrivait un lignage cellulaire dans lequel une cellule précise meurt au cours du développement. Nous avons donc décidé d'étudier les mécanismes qui conduisent à la mort cellulaire d'une seule des deux cellules filles au cours du lignage md-solo. Comme attendu, nous avons montré que cette différence est contrôlée par *numb* et *Notch* (Orgogozo et al., 2002). Cette série d'expériences a été très longue à mettre au point car j'ai dû faire des triples marquages avec des sondes ARN in situ et des anticorps, sur des embryons ayant subi dans certains cas des chocs thermiques.

Ayant vu mes figures d'apoptose dans l'embryon, Michel Gho a alors observé que le cytoplasme de la cellule gliale du lignage des microchètes se fragmente également, indiquant que la cellule gliale meurt aussi par apoptose (Fichelson et Gho, 2002) ! En fait, il semble que de nombreuses cellules issues de différents lignages sensoriels meurent ainsi de façon stéréotypée au cours du développement de *D. melanogaster* (voir article 4).

Projet 3!: migration des cellules sensorielles

La protéine Slit est sécrétée par les cellules de la ligne médiane et elle est requise pour les divisions asymétriques de certains neuroblastes (Mehta et Bhat, 2001). On pouvait donc envisager que Slit contrôle aussi les divisions asymétriques des lignages sensoriels de l'embryon. Pour tester cette hypothèse, j'ai analysé le phénotype des mutants *slit*. J'ai ainsi remarqué que *slit* n'est pas impliqué dans le contrôle des divisions des cellules sensorielles mais empêche les cellules sensorielles de traverser la ligne médiane au cours de l'embryogenèse.

Projet 4!: un seul lignage canonique pour divers organes sensoriels

Mes observations concernant le lignage des organes sensoriels externes de l'embryon m'ont invitée à analyser en détail et à réinterpréter les résultats qui avaient été obtenus précédemment pour les autres organes sensoriels et je me suis rendue compte qu'il existait en fait une extraordinaire ressemblance entre ces lignages - ce qui ne saute pourtant pas aux yeux quand on regarde la figure 11 ! J'ai été très contente de découvrir toutes ces ressemblances petit à petit au fil de mes lectures et toutes les similitudes que j'ai pu trouver sont présentées dans la revue que j'ai écrite avec Eric Lai.

Projet 5!: apoptose dans les lignages et évolution du patron du SNP

Les deux lignages que j'ai décrits sont très semblables, suggérant qu'une petite différence génétique pourrait être responsable de la transformation du lignage md-es en lignage md-solo (ou inversement) à certaines positions dans l'embryon. Pour savoir si ce changement a pu apparaître au cours de l'évolution, j'ai commencé à analyser le patron des organes sensoriels de l'embryon chez différentes espèces de Drosophilidés. Mes observations

indiquent que le patron des organes sensoriels des segments abdominaux de la larve de *D. melanogaster* n'a pas changé depuis plus de 60 millions d'années. Cependant, l'analyse des embryons de *D. busckii* suggère que le patron des organes sensoriels a bien évolué grâce à la transformation d'un lignage cellulaire en un autre.

ARTICLE 1

Lineage, cell polarity and *Inscuteable* function in the peripheral nervous system of the Drosophila embryo

Lineage, cell polarity and *inscuteable* function in the peripheral nervous system of the *Drosophila* embryo

Virginie Orgogozo, François Schweisguth* and Yohanns Bellaïche*

Ecole Normale Supérieure, UMR 8544 46, rue d'UIm, 75230 Paris Cedex 05, France *Authors for correspondence (e-mail: schweisg@wotan.ens.fr and bellaich@wotan.ens.fr)

Accepted 15 December 2000; published on WWW 7 February 2001

SUMMARY

The stereotyped pattern of the Drosophila embryonic peripheral nervous system (PNS) makes it an ideal system to use to identify mutations affecting cell polarity during asymmetric cell division. However, the characterisation of such mutations requires a detailed description of the polarity of the asymmetric divisions in the sensory organ lineages. We describe the pattern of cell divisions generating the vp1-vp4a mono-innervated external sense (es) organs. Each sensory organ precursor (SOP) cell follows a series of four asymmetric cell divisions that generate the four es organs cells (the socket, shaft, sheath cells and the es neurone) together with one multidendritic (md) neurone. This lineage is distinct from any of the previously proposed es lineages. Strikingly, the stereotyped pattern of cell divisions in this lineage is identical to those described for the embryonic chordotonal organ lineage and

INTRODUCTION

Most specialised functions of eukaryotic cells require subcellular asymmetries also referred to as cell polarity. During asymmetric cell division, cell polarity is revealed by the localisation of cell fate determinants at one pole of the mitotic spindle. The establishment of a polarity axis is therefore essential for the unequal segregation of cell fate determinants, and, hence, for the adoption of distinct identities by the two daughter cells. Studies in *Drosophila* have shown that at least two different signalling pathways can establish and maintain cell polarity during asymmetric cell division (Jan and Jan, 2000).

The first one depends on the activity of the *inscuteable* (*insc*) gene, which has been shown to regulate the asymmetric division of neuroblasts in the embryonic central nervous system (CNS). Following delamination from the neuroectoderm, neuroblasts divide with an apical-basal polarity to produce a neuroblast and a smaller ganglion mother cell (GMC). The insc gene is specifically expressed in neuroblasts as they delaminate (Kraut and Campos-Ortega, 1996; Kraut et al., 1996), and the Insc protein is recruited by Bazooka to the apical stalk of delaminating neuroblasts (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999). A number of proteins, including Numb, Partner of Numb (Pon), Prospero for the adult thoracic bristle lineage. Our analysis reveals that the vp2-vp4a SOP cells divide with a planar polarity to generate a dorsal pIIa cell and a ventral pIIb cell. The pIIb cell next divides with an apical-basal polarity to generate a basal daughter cell that differentiates as an md neurone. We found that Inscuteable specifically accumulated at the apical pole of the dividing pIIb cell and regulated the polarity of the pIIb division. This study establishes for the first time the function of Inscuteable in the PNS, and provides the basis for studying the mechanisms controlling planar and apical-basal cell polarities in the embryonic sensory organ lineages.

Key words: *Drosophila*, Sense organ, Lineage, Cell polarity, Inscuteable

(Pros) and Miranda localise to the basal pole and specifically segregate to the GMC (Hirata et al., 1995; Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Knoblich et al., 1995; Lu et al., 1998; Rhyu et al., 1994; Shen et al., 1997; Spana and Doe, 1995). The activity of the *insc* gene is necessary to direct the basal localisation of Numb, Pon, Pros and Miranda during metaphase, and to orient the mitotic spindle perpendicularly to the plane of the epithelium (Kaltschmidt et al., 2000; Kraut et al., 1996; Yu et al., 2000). The polarising activity of the Insc protein depends on its direct binding to the Partner of Inscuteable (Pins) protein. Pins directly binds the Gαi protein, and possibly also the Gαo protein, suggesting that Insc might function by triggering a G protein signalling pathway (Parmentier et al., 2000; Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000).

A second signalling pathway depends on the activity of a seven-pass transmembrane receptor, Frizzled (Fz). During pupal development, Fz regulates the polarity of the bristle sensory organ precursor cell (SOP), also referred to as the primary precursor (pI) cell, which divides asymmetrically to produce the pIIa and pIIb cells (Gho and Schweisguth, 1998; Hartenstein and Posakony, 1989). This division is planar and oriented along the anterior-posterior (a-p) axis of the pupa. Numb and Pon localise to the anterior cortex of the pI cell and segregate to the anterior daughter cell, which will therefore adopt the pIIb fate (Gho and Schweisguth, 1998; Lu et al.,

632 V. Orgogozo, F. Schweisguth and Y. Bellaïche

1998; Rhyu et al., 1994; Uemura et al., 1989). Frizzled signalling orients the pI division along the a-p axis of the pupa and is also required for the strictly unequal segregation of the cell fate determinant Numb into only one of the pI daughter cell (Bellaïche et al., 2000; Gho and Schweisguth, 1998). The division of the pIIa cell is also planar and oriented along the a-p axis, while the pIIb cell is polarised perpendicularly to the plane of the epithelium (Gho et al., 1999). However, the orientation of the pIIa and pIIb divisions appear to be independent of fz (Gho and Schweisguth, 1998; R. Leborgne and F.S., unpublished observations), suggesting that additional mechanisms might control cell polarity in the peripheral nervous system (PNS).

A better understanding of the mechanisms regulating cell polarity during asymmetric division might benefit from an analysis of the numerous lethal mutations known to affect PNS development in the embryo (Jan et al., 1987; Kania et al., 1995; Salzberg et al., 1994). However, a phenotypic analysis of these mutations would first require the identification of the SOPs, their progeny cells and each division in these lineages. In the case of the embryonic mono-innervated external sense (es) organs, current models suggest that they are produced by two types of SOPs: the solo-es and the multidendritic (md)-es SOPs (Bodmer et al., 1989; Brewster and Bodmer, 1995; Vervoort et al., 1997). Results from both BrdU labelling and clonal analyses have indicated that the solo-es SOP generates, via a series of three asymmetric cell divisions, the four cells composing one es organ: the neurone, shaft, socket and sheath cells. The md-es SOP generates one additional cell, an md neurone. On the basis of clonal and mutant phenotypic analyses, two different models have been proposed for the mdes lineage (Brewster and Bodmer, 1995; Vervoort et al., 1997).

We describe the complete lineages produced by the five SOPs giving rise to the ventral papilla (vp) 1 to 4a (nomenclature according to Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Irrespectively of their previous classification as solo-es (vp1-4) or md-es (vp4a) SOPs, we found that these five SOPs, or pI cells, follow an identical series of four asymmetric divisions to generate one md neurone and the four cells forming one mono-innervated es organ. This md-es lineage differs from the two previously proposed md-es lineages in that the md neurone is generated by the division of the pIIb cell, identified here as the cell that has received Numb during the mitosis of pI. We also report that the division of the md-es pI cell is planar while the pIIb cell divides with an apical-basal polarity. Finally, the possibility of recognising each division allowed us to analyse the function of the insc gene in the embryonic PNS. We show that it directs the apical-basal polarity of the pIIb cell and regulates the specification of the md neurones in the embryo.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks

A yw stock was used as a wild-type stock. The AB44 line carries a PlacW enhancer-trap insertion at the *insc* locus (Kraut and Campos-Ortega, 1996). The E7-2-36 and A1-2-29 PlacW enhancer-trap lines express *lacZ* in md neurones, and in the socket and shaft cells, respectively (Bier et al., 1989). The CutA3 line carries a transgene expressing *lacZ* under the control of a *cut* enhancer (Jack and DeLotto, 1995). In this line, the cytoplasmic β -galactosidase protein

specifically accumulates in the es cells from late stage 12 onwards. The *insc*²² mutant allele behaves as a genetic null and carries a nonsense mutation at codon 82 (Buescher et al., 1998; Grzeschik et al., 1999). *insc*²² homozygote embryos from *insc*²²/*Cyo,wg-lacZ* or *insc*²², E7-2-36/*Cyo,wg-lacZ* stocks were identified by the absence of β -galactosidase staining.

Immunostaining and microscopy

Embryos were fixed and stained as previously described (The et al., 1999). Antibodies were used at the following dilutions: mouse anti-Cut, 1/1000 (DSBH); rat anti-Elav, 1/4 (DSBH); mouse anti-βgalactosidase, 1/5000 (Promega); rabbit anti-β-galactosidase 1/2000 (Cappel); rabbit anti-Pros, 1/1000 (gift of Y.-N. Jan); rabbit anti-Numb, 1/1000 (gift of Y.-N. Jan); rabbit anti-Miranda, 1/1000 (gift of F. Matsuzaki); and rabbit anti-Insc, 1/1000 (gift of B. Chia). Biotinylated, Alexa-488, Alexa-596, Cy5 anti-mouse, rat or rabbit, 1/1000 secondary antibodies were purchased from Molecular Probes or Jackson Laboratories. To detect Cut in the pI cell, the signal was amplified using the Renaissance kit (NEN). The DNA was stained using either TOTO-3 (1/3000, Molecular Probes) or propidium iodine (0,2 µg/ml, Sigma). Images were collected on a Leica NT confocal microscope and processed using NIH-image and Adobe Photoshop software. Figures show either a single confocal section or the maximal projection of several confocal z sections. In Figs 2C,D, 6C,C''' and 9E, the CNS signal detected in the bottom z sections, i.e. below the vpl organ, was reduced to better show the vpl cells in the z-projected images.

RESULTS

The vp1-vp4a es organs are arranged in a circular arc in the ventral PNS

The external sensory organ cells are arranged in a segmental, highly stereotyped fashion, and each es organs cell can be reliably identified using anti-Cut antibodies in stage 16 embryos (Blochlinger et al., 1988; Blochlinger et al., 1990). In order to describe the pattern of cell divisions in the es organ lineage, we followed the divisions of the Cut-positive es precursor cells between stages 11 and 16. We focused our analysis on the five mono-innervated es organs located in the ventral region, vp1-vp4a, because this region is particularly outstretched following germ-band elongation, thus facilitating the identification of each es organ cell. In stage 16 embryos, the vp1-vp4a organs are arranged in a circular arc (Fig. 1). Each organ is composed of four Cut-positive cells. The socket and shaft cells, which lie within the epithelium, are strongly labelled by anti-Cut antibodies, whereas the neurone and the sheath cell, which are subepidermal, are more weakly labeled (Blochlinger et al., 1988; Blochlinger et al., 1990). The Elav and Pros proteins accumulate specifically in the neurone and in the shaft cell, respectively (Bier et al., 1988; Vaessin et al., 1991). The vp4a organ is found relatively close to the weakly Cut-positive anterior ventral md neurone called vdaa. A previous study has shown that the vdaa and vp4a cells are born from the same md-es lineage (Brewster and Bodmer, 1995). In the centre of the ventral region, the four vda_{A-D} and the ventral bipolar (vbp) md neurones, which are clustered together, are also weakly labeled by anti-Cut antibodies.

pl divides within the plane of the epithelium and along the dorsal-ventral axis

At stage 11, five isolated cells that accumulate Cut appear at

stereotyped positions in the ventral region. Based on their position, these cells correspond to the pI cells of the five vp1vp4a organs. We took advantage of the slight asynchrony observed in the timing of the pI divisions from one segment to another to establish the origin of the increasing number of Cutpositive cells. Indeed, we noticed that cell divisions in the vp1vp4a lineages tend to occur slightly earlier in anterior segments relative to more posterior ones (Fig. 2A,A'). The observation of a single Cut-positive pI cell dividing at the vp2 position in the abdominal hemisegment A7 and of two Cut-positive cells at the same position in A6 led us to conclude that the two cells observed in A6 are sister cells born from one pI cell (Fig. 2A,A'). Thus, lineage relationship could be inferred from the direct observation of dividing cells on fixed samples.

The analysis of the positions of the two pI daughter nuclei at telophase indicates that pI divides within the plane of the epithelium (Fig. 3B). Numb localises asymmetrically in pI at metaphase and is inherited by one of the two daughter cells at telophase (Fig. 3A,B). The pI daughter cell inheriting Numb is the pIIb cell and its sister is pIIa. In the case of the vp2-vp4a organs, the two daughter nuclei are positioned along the dorsal-ventral (d-v) axis, and Numb forms a ventral crescent at metaphase and segregates to the ventral daughter cell at telophase (Fig. 3D). We conclude that, at the vp2-vp4a position, pI divides with a stereotyped d-v planar polarity. In contrast, the division of the vp1 pI cell is randomly oriented within the plane of the epithelium with Numb segregating in only one daughter cell (Fig. 3D).

pllb divides asymmetrically with an apical-basal polarity

At stage 12, the anterior-ventral cell of each pIIa-pIIb cell pair seen at the vp2-vp4a position enters mitosis (Figs 2B, 3E). The position of the daughter nuclei relative to the surface of the embryo at telophase indicates that pIIb divides roughly perpendicular to the plane of the epithelium (Fig. 4B). The orientation of the pIIb division was confirmed by analysing the orientation of the mitotic spindle and the position of the centrosomes (data not shown), but we could not measure precisely the orientation of the mitotic spindle in the dividing pIIb cell because the curvature of the epithelium in the gastrulating embryo precludes a precise determination of its orientation relative to the epithelial surface. Numb, Pon, Miranda and Pros, which is first detected in the dividing pIIb cell, localise to the basal pole of the pIIb cell at metaphase (Fig. 4A,C,C' and data not shown) and segregate to the basal daughter cell (Fig. 4B,D,D'). Noticeably, at telophase, the basal daughter cell appears to be significantly smaller than its apical sister (Fig. 4B). This indicates that pIIb generates two cells of different size. However, following pIIb division, no difference in nuclear size is detected using the Pros and Cut markers. We conclude that, at the vp2-vp4a position, the pIIb division is polarised along the apical-basal axis of the epithelium.

At the vp1 position, one of the two pI daughter cells expresses Pros and divides with an apical-basal polarity to generate a basal cell that inherits both Numb and Pros (data not shown). Based on these observations, we conclude that the second cell division observed at the vp1 position is the pIIb division, as shown for the vp2-vp4a positions.

We called X the small basal pIIb daughter cell that has



Fig. 1. The vp1-vp4a es organs form a circular arc at stage 16. Diagram of the vp1-vp4a mono-innervated es organ cells and the vdaa, vda_{A-D} and vbp md neurones in the ventral region of the A1-7 hemisegments. (Nomenclature according to Campos-Ortega and Hartenstein, 1997.) The socket (so) and shaft cells (sf), which accumulate a high level of Cut, are shown in white. The Cut- and Pros-positive es sheath cells (sh) are in green and the Cut- and Elavpositive es neurones (n) are in blue. The vdaa md neurone, which has been shown to be related by lineage to the vp4a organ, is in blue (Brewster and Bodmer, 1995). The vda_{A-D} and vbp neurones are in grey.

specifically inherited Pros, and pIIIb its apical sister. Soon after the pIIb division, the only es cell to accumulate Pros is the X cell (Fig. 4D,D'; see also vp2 in Fig. 2B,B'). In early stage 13 embryos, in which all pIIb cells have divided, two Pros-positive cells are observed: the basal highly Pros-positive X cell and the apical weakly Pros-positive pIIIb cell (Fig. 4E,E'; see also the legend to Fig. 7).

plla divides next to generate the socket and shaft cells and plllb divides last

At early stage 13, a Pros-negative pIIa cell entering mitosis can be observed (Fig. 5A,A'; see also vp2 from segment A3 in Fig. 2C,C'), while clusters of four cells are seen at the corresponding position in adjacent hemisegments. These clusters contain the highly Pros-positive X cell, the weakly Pros-positive pIIIb cell and two Pros-negative cells (Fig. 5B,B'; see also vp2 from segment A5 in Fig. 2C,C'). We conclude that the two Pros-negative cells are the pIIa daughter cells. These cells are localised in the superficial epidermal layer and are strongly Cut positive (Figs 5B, 2C). These two strongly Cutpositive cells are observed in the epidermis at the vp1-vp4a positions from stage 13 onwards (Fig. 2D). At stage 16, these two cells express A1-2-29, a socket and shaft cell marker (data not shown). These observations indicate that the division of pIIa generates the socket and shaft cells.

At late stage 13, the weakly Pros-positive pIIIb cell enters mitosis (Fig. 5C). Pros is asymmetrically localised in dividing pIIIb and is inherited by only one daughter cell at telophase (Fig. 5C-D"). We also observed that the X and pIIIb cells both accumulate Elav, a neuronal marker. The X cell can be easily identified as it accumulates a higher level of Elav. In contrast to Pros, Elav segregates equally into the two pIIIb daughter cells at telophase (Fig. 5D-D"). Following the pIIIb division,

634 V. Orgogozo, F. Schweisguth and Y. Bellaïche

Fig. 2. Establishing the pattern of cell divisions in the vp1vp4a lineages. (A-D) Embryos stained for Cut (red), DNA (blue) and Numb (green in A) or Pros (green in B,C,D) are shown on the left. (A'-D') Corresponding schematic representations of the Cut-positive cells are presented on the right. In this representation, mitotic DNA is in blue, and Numb (A') or Pros (B',C',D') is in green. Dividing cells were identified based on DNA staining and on the diffuse Cut staining, which reveals nuclear envelope breakdown. Because several confocal sections were projected to visualise all PNS Cut-positive cells, some Cut-positive cells do not appear as individually labelled nuclei (see vp1 in A' for example). Importantly, all z sections were analysed to draw the diagrams shown in A', B', C' and D'. The ventral midline and the intersegmental borders are represented by horizontal and vertical black lines, respectively. (A,A') Ventral view of the segments A6 (left) and A7 (right) in a stage 11 embryo. The vp1-vp4a precursor cells are found at symmetrical positions on either side of the ventral midline, which is also Cut positive, thus facilitating their identification. In this embryo, the vp3 pI cells and some vp1 pI cells cannot vet be detected using Cut as a marker. Based on Cut immunoreactivity, the pI cells appear in the following order: vp4a > vp2 > vp4 > vp1> vp3. In segment A7, the vp2 pI cell is in anaphase (arrow), with Numb segregating to the ventral daughter cell, while two Cut-positive cells are seen at the vp2 position in segment A6 (arrow). This illustrates how a lineage relationship can be established between a dividing precursor cell and its two daughter cells by comparing identical positions in adjacent segments. (B,B') Lateral view of the segments A1 (left) and A2 (right) in a stage 12 embryo. At the vp2 position in A1 (left arrow), the pIIb cell is in metaphase. At the vp2 position in A2 (right arrow), three cells are seen, including one basal Prospositive cell (in green). At the vp4a position in A1, three cells are detected, one highly Pros-positive cell (dark green), one weakly Pros-positive cell (light green) and one Pros-negative cell. At this stage, one or two clustered Cutpositive cells are also observed anteriorly to the vp1 position (square brackets in B'). (C,C') Lateral view of the segments A3 (left) and A5 (right) of an early stage 13 embryo. At the vp2 position in A3 (left arrow), the Prosnegative cell is in metaphase. In A5, at the same position (right arrow), two Pros-negative and highly Cut-positive cells are observed next to the two Pros-positive cells. In addition to the vp1-vp4a cells, one Cut-positive cell is found anteriorly to the vp1 position in A5 (square brackets in C'). This cell is in telophase and Pros is asymmetrically partitioned into the dorsal daughter cell. The precise relationship between this mitotic cell and the Cut-positive cells observed at this position in stage 12 embryos (B,B') was not established. (D,D') Lateral view of the segments A2 (left) and A3 (right) of a late stage 13 embryo. At the vp4a position in A3 (right arrow), one of four vp4a cell is



in telophase, with Pros segregating unequally into the dorsal daughter cell. At the vp4a position in A2, five cells are seen. Anteriorly to the vp1 cell, two Cut-positive cells can be seen (square brackets in D') with the dorsal-most cell accumulating a higher level of Pros. These two cells may be born from the mitotic cell observed at this position in stage 12 embryos (square brackets in C'). Scale bar: $5 \mu m$.

the vp1-vp4a clusters are composed of five cells: the socket and shaft cells, the two pIIIb daughter cells and the X cell.

The X cell adopts an md fate

At stage 13, each X cell occupies a stereotyped position. The vp4a X cell is located dorsally between the vp4a and vp4 clusters, and each of the vp1-vp4 X cells is found nearest the

centre of the circular arc formed by the vp1-vp4a cells (Fig. 6A-B"; see also Fig. 2C,D). The accumulation of Elav in the X cell indicates that X may become a neurone. To determine the fate of the X cell, we have compared the position of the Pros- and Elav-positive X cells in adjacent hemisegments of late stage 13 embryos (Fig. 6A-B"). This analysis suggests that the vp1-vp4 X cells migrate towards the centre of the vp1-vp4a



Fig. 3. The vp2-vp4a pI cells divide with a stereotyped dorsal-ventral planar polarity. (A-C) The polarity of the pI division was examined in stage 11-12 embryos stained for Cut (in red), Numb (in green) and DNA (in blue). Numb localises asymmetrically to the ventral pole at metaphase in the vp4a pI cell (A) and is inherited by the ventral pI daughter cell at telophase (B). The pIIa and pIIb nuclei remain within the plane of the epithelium. At stage 12, the ventral pI daughter cell, i.e. pIIb, enters mitosis (C). (D) The orientation of the planar division of pI was determined by measuring the angle between the d-v axis of the embryo and a vector that originates in the centre of pI and that points towards the centre of the Numb crescent. The angle value is between 0° and 180° when the Numb crescent is positioned anteriorly, and between 0° and -180° when the Numb crescent is positioned posteriorly. The mean value is indicated by an arrow and the standard deviation by a sector. The following orientations were measured: vp2, $19^{\circ}\pm 23$ (*n*=30); vp3, $33^{\circ}\pm 35$ (n=19); vp4, $-2^{\circ}\pm 14$ (n=30); vp4a, $-4^{\circ}\pm 45$ (n=30). (E) The position of the secondary precursor cell that divides first was determined as described above by measuring the angle between the d-v axis and a vector that joins the two pI daughter nuclei and points towards the dividing cell. The mean value is indicated by an arrow and the standard deviation by a sector. The following orientations were measured: vp2, 51°±60 (*n*=30); vp3, 29°±31 (*n*=30); vp4, -2°±13 (n=30); vp4a, 10°±54 (n=30). The cells that divide are in blue in D,E. In this and following Figs, unless noted otherwise, anterior (A) is towards the left and dorsal (D) is upwards. Scale bar: 3.5 µm.

circular arc, while the vp4a X cell migrates dorsally. Consistent with a migratory behaviour, the X cells display long cytoplasmic extensions at this stage (Fig. 5E). The level of Pros



Fig. 4. pIIb divides asymmetrically with an apical-basal polarity. Sensory organ cells at the vp4 (A,B) and vp4a (C-E') positions were labelled with Cut (in red), and dividing cells were identified by DNA staining (in blue). Numb (A,B) and Pros (C-E') are in green. Apical (Ap) is upwards. Numb and Pros localise asymmetrically to the basal pole of pIIb at metaphase (A,C,C') and segregate to the basal pIIb daughter cell at telophase (B,D,D'). At telophase, a difference in the size of the pIIb daughter cells is observed, with the basal cell being significantly smaller than its apical sister (B). Following this division, two Pros-positive cell are observed: a highly Pros-positive basal X cell and a weakly Pros-positive apical pIIIb cell (E-E'). Scale bar: 3.5 μ m.

accumulation in the migrating Cut- and Elav-positive X cells appears to decrease over time, and becomes undetectable when these cells cluster in the centre of the circular arc at stage 14. At this stage, these Cut-positive X cells can still be identified on the basis of their stereotyped position and of their high level of Elav accumulation. These cells occupy the positions of the vda_{A-D}/vbp cluster and of the vdaa neurone and, from stage 14 onwards, express the E7-2-36 md marker (Fig. 6C-C''', Bier et al., 1989). These data indicate that the vp4a X cell migrates dorsally and becomes the vdaa md neurone, whereas the four vp1-vp4 X cells migrate towards the centre of the circular arc to form four of the five vda_{A-D}/vbp neurones. The fifth vda_{A-D}/vbp neurone corresponds to the additional Cut-, Prosand Elav-positive cell that migrates (together with the vp1 md neurone) towards the centre of the circular arc (Fig. 6A-A''').



Fig. 5. pIIa and pIIIb cells divide, producing a total of five cells. (A-D") Sensory organ cells at the vp2 position were identified by anti-Cut staining (in red). Pros is in green (A-D'), and Elav is in blue (D-D"). Mitoses were identified by DNA staining (in blue in A-C). (A,A') The Prosnegative pIIa cell enters mitosis. Numb is asymmetrically localised in dividing pIIa and is inherited by one of the two daughter cells (data not shown). The X cell is subepidermal, but appears next to the pIIa and pIIIb cells, owing to the projection of several confocal *z* sections. (B-B') Four cells are observed: the subepidermal X cell, the pIIIb cell and two highly Cut-positive, Pros-negative cells that are identified as the socket (so) and shaft (sh) cells. (C-D") The pIIIb cell, identified as the weakly Pros-positive cell in B and B', divides next (C, metaphase; D-D", telophase). Elav accumulates at a high level in the X cell and at a low level in the dividing pIIIb (D-D"). Pros is asymmetrically localised at metaphase (C) and is inherited by only one daughter cell at telophase (arrows in D'), whereas Elav segregates to both daughter cells (arrows in D"). (E) At stage 13, the X cell of the vp1 organ, identified according to its position, displays long cytoplasmic extensions as revealed by β -galactosidase staining (green) in CutA3 embryos. Scale bars: in A, 7 µm for A,A'; in B, 7 µm for B,B'; in C, 3.5 µm for C-D"; in E, 7 µm for E.

This fifth md neurone probably originates from a Cut-positive precursor cell detected anterior to vp1. This precursor cell divides asymmetrically at late stage 12 to generate a Pros- and Elav-positive cell that migrates dorsally (see brackets in Fig. 2B-C').

The es neurone and sheath cell are born from the pllb cell

From stage 14 onwards, one of the two pIIIb daughter cells accumulates a higher level of Elav, and is therefore identified as the es neurone (Fig. 6B"). Its sister cell accumulates a high level of Pros and is thus identified as the sheath cell (Fig. 6B'). No additional division is observed in the vp1-vp4a lineages after the pIIIb division.

In summary, this analysis shows that the vp1-vp4 es SOPs do not follow a solo-es lineage, as previously proposed, but rather produce four md neurones that most likely correspond to the four vda_{A-D} organs (see Discussion). The vp4a SOP follows an identical lineage and generates the vdaa md neurone. In this novel md-es lineage, the md neurone is generated by the division of the pIIb cell.

insc is specifically expressed in the pllb cell

Our detailed analysis of the vp1-vp4a lineages allowed us to investigate the mechanisms regulating cell polarity in these lineages. In this paper, we analyse the role of the *insc* gene. Previous studies have indicated that *insc* is expressed in pI, suggesting a role for *insc* in regulating cell polarity in these lineages (Knirr et al., 1997; Kraut and Campos-Ortega, 1996). However, previous studies of *insc* mutant embryos have failed to reveal a role of *insc* in the es lineages (Knirr et al., 1997; Kraut et al., 1996; Schober et al., 1999). In a first step, we have re-examined the expression pattern of *insc* in the vp1-vp4a lineages. We found that the Insc protein is not detectable in dividing pI, pIIa and pIIIb cells, but specifically accumulates in an apical crescent in dividing pIIb cells (Fig. 7A-C' and data not shown). The lack of *insc* expression in pI is further confirmed by the analysis of an *insc-lacZ* enhancer-trap marker that has been previously used to document the expression of *insc* in pI cells in single-labelling experiments (Kraut and Campos-Ortega, 1996). The expression of *insc-lacZ* is not detectable in pI and pIIa. However, it is first detected in the pIIb cell as it divides and specifically accumulates in both pIIb daughter cells (Fig. 7D-F').

insc regulates the apical-basal polarity of the pllb division

We next analysed the role of *insc* in regulating cell polarity in the vp1-vp4a lineages. In *insc* mutant embryos, the vp1-vp4a pI divisions occur within the plane of the epithelium. The vp2, vp4 and vp4a pI cells divide with a d-v orientation with Numb localising asymmetrically to the ventral pole of pI (Fig. 8A). Furthermore, the cell that divides next is always found at an antero-ventral position in both wild-type and *insc* mutant embryos (compare Fig. 3E with Fig. 8B), suggesting that the pIIa and pIIb cells are correctly specified. We conclude that the loss of *insc* activity does not affect the polarity of the pI division. This is entirely consistent with our observation that the Insc protein is not present in the pI cell.

To analyse the role of *insc* in the dividing pIIb cell, we studied the asymmetric distribution of Miranda, an adaptor protein for Pros (Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Shen et al., 1997). In wild-type embryos, Miranda accumulates to the basal pole of pIIb at metaphase (Fig. 8C,C',H). In contrast, Miranda localises asymmetrically to the basal pole in only 32% of *insc* mutant pIIb cells at metaphase. In the other pIIb cells, Miranda is either partly (52%) or largely (16%) delocalised around the cell cortex (Fig. 8D-E',H). This shows that *insc* is required for the basal localisation of Miranda.

We then analysed the distribution of Pros, which is the earliest marker for the fate of the md and pIIIb cells in the vp1-vp4a lineages (Figs 4E,E', 8F,F'). We found an equal level of



Fig. 6. The migrating X cell becomes an md neurone. (A-B") Sensory organ cells at the vp1-vp4a positions were analysed in embryos stained for Cut (in red), Pros (in green) and Elav (in blue). At late stage 13, the positions of the four X cells produced by the vp1-vp4 lineages vary from one segment to the next (compare segments A4 and A5 in panel A), suggesting that these cells migrate towards the position of the vdaA-D/vbp cluster. One additional Cut-, Pros- and Elav-positive cell is seen just anterior to the vp1 X cell (brackets in A-B"). (B-B") Separate channels are displayed for the segment A4 shown in A. The five X cells (outlined) accumulate Cut (B), Pros (B') and Elav (B"). The two pIIIb daughter cells are Prospositive, whereas Elav starts to accumulate in only one pIIIb daughter cell (see arrowheads at the vp1 position in B-B"). At later stages, the level of Pros accumulation decreases in the Elav-positive cell and concomitantly increases in the Elav-negative cell (not shown). (C-C"") md neurones were identified in late stage 14 embryos stained for Cut (in red). Elay (in blue) and E7-2-36 (in green). The vp4a X cell is shown to express the E7-2-36 md marker, identifying it as the vdaa neurone. The four vp1-vp4 X cells also express this md marker and are found at the position of the vda_{A-D}/vbp cluster (outlined in C). The fifth cell of the vda_{A-D}/vbp cluster is probably the cell that migrates together with the vp1 X cell (brackets in A-B"). Asterisks in C"" indicate the vdap and v'dap md neurones. Scale bars: in A, 5 μ m; in B, 5 μ m for B-B"; in C, 5 μ m for C-C'''.



Fig. 7. Insc is specifically localised at the apical pole of the dividing pIIb cell. (A-C') The accumulation of Insc (in green) was analysed in embryos stained for Cut (in red) and the DNA (in blue). Insc is not detected in dividing pI (A,A') and pIIIb (C,C') cells, and is detected at the apical pole of dividing pIIb cells (B,B'). The confocal z sections showing the subepidermal pIIIb and md cells were projected in C,C'. The socket and shaft cells that lie in the epidermis can be seen in the inset shown in C, for which the whole stack was projected. (A,A',C,C'). Anterior is towards the left and dorsal is upwards. (B,B') Apical is upwards. In A,A',C,C', the green channel was set at a higher gain than in B, B' to show the absence of Insc accumulation in pI and pIIIb. (D-F') The expression of insc-lacZ was studied in embryos heterozygous for the AB44 enhancer-trap insertion and stained for Cut (in red) and β -galactosidase (in green). The β -galactosidase protein is first detected in dividing pIIb cells (D,D'; the diffuse Cut staining in D identifies the pIIb cell as it divides). The β -galactosidase protein is seen to accumulate equally in both pIIb daughter cells (arrows in E). Following the division of the precursor giving rise to the socket and shaft cells, the β -galactosidase protein is absent from the socket and shaft cells (F,F') and accumulates in the two other Cut-positive cells (arrows in F). Because of its stability and of its equal distribution at mitosis, the β galactosidase protein could be used as a marker for the pIIb daughter cells. At stage 13, the β -galactosidase is not detected in the socket and shaft cells, implying that these two cells are not born from a pIIb daughter cell. The socket and shaft cells are therefore generated by the division of the pIIa cell (Fig. 7F-F'). Since we have shown that the socket and shaft cells are generated by a Pros-negative precursor cell (Figs 2C, 5A-B'), we conclude that this Pros-negative precursor cell is pIIa and that the two Pros-positive md and pIIIb cells are pIIb daughter cells. This analysis of the expression of insc-lacZ demonstrates that the weakly Pros-positive cell, that we called pIIIb (Fig. 4E,E'), is a pIIb daughter cell. Scale bar: $7 \mu m$.

Pros accumulation in 27% of the pIIb daughter cells in *insc* mutant embryos (Fig. 8G,G',I). This indicates that *insc* is required to regulate the unequal segregation of Pros during the



Fig. 8. Insc regulates the apical-basal polarity of the pIIb cell division. (A,B) The orientation of the planar division of pI (A) and the position of the cell that divides next (B) were analysed in *insc* mutant embryos, as described in the legend to Fig. 3. The following orientations were measured: vp2, $10^{\circ}\pm34$ (*n*=30); vp4, $-4^{\circ}\pm12$ (*n*=30); vp4a, $-1^{\circ}\pm28$ (*n*=30) in A, and vp2, $56^{\circ}\pm47$ (*n*=30); vp3, $41^{\circ}\pm32$ (*n*=30); vp4, $-3^{\circ}\pm12$ (*n*=30); vp4a, $25^{\circ}\pm50$ (*n*=30) in B. The loss of *insc* activity has no effect on the polarity and orientation of the pI division. nd, not determined. (C-E') The distribution of Miranda (in green) in dividing pIIb cells was analysed in embryos stained for Cut (in red) and the DNA (in blue). In wild-type embryos, Miranda localises to the basal pole of pIIb at metaphase (C,C'). In *insc* mutant embryos, Miranda can be found either at the basal pole (not shown), partly delocalised from the basal pole (D,D') or uniformly distributed at the cell cortex (E,E') at metaphase. Apical is upwards and anterior is towards the left in C-E'. (F-G') The accumulation of Pros (in green) in the pIIb daughter cells was studied in embryos stained also for Cut (in red). In wild-type embryos, the Pros staining is stronger in the basal pIIb daughter cell than in the apical pIIb daughter cell in 99% of the case (*n*=100) (F,F'). In contrast, Pros accumulates to similar levels in the two pIIb daughter cells in 27% of the cases (*n*=136) (G-G'). Anterior is towards the left and dorsal is upwards. Note that in this projection the basal pIIb daughter cell appears dorsal (F,F'). (H) Quantification of the Miranda localisation phenotype, at prometaphase in wild-type (*n*=14) and *insc* mutant (*n*=13) embryos and at metaphase in wild-type (*n*=20) and *insc* mutant (*n*=20) embryos. Scale bar: 3.5 µm.

pIIb division and/or to establish a fate difference between the two pIIb daughter cells.

insc regulates the fate of the md neurone and of the pllb cell

We then investigated the role of *insc* in regulating cell fate decisions in the vp1-vp4a lineages. We initially focused our attention on the vp4a organ because this lineage generates one md neurone that migrates very little, which greatly facilitates the identification of all the cells produced by the vp4a lineage. We used Cut, Elav and E7-2-36 as cell fate markers to identify the vp4a socket, shaft and sheath cells, and the es neurone and the vdaa md neurone at stage 16 (Fig. 9A). At all vp4a positions in *insc* mutant embryos, the socket and shaft cells are always present. In some segments, however, the vdaa md neurone is duplicated and the vp4a es neurone and sheath cell are missing (Fig. 9B). This suggests that the pIIIb cell has been transformed into a second md neurone. In some other segments, a single Elav-positive, E7-2-36-negative cell is seen at the position of the vp4a es neurone and sheath cell (Fig. 9C). This suggests that the pIIIb cell has failed to divide. In yet other segments, the two cells at the position of the es neurone and sheath cell express variable levels of Elav, indicating that the two pIIIb daughter cells are not correctly specified (Fig. 9D). We conclude that *insc* regulates the fate of the pIIb daughter cells.

We next extended this analysis to the vp1-vp4 lineages (Fig. 9E-H). As shown for the vp4a organ, the socket and shaft cells are always detected, while the neurone and sheath cells form properly in only 66% (n=124) of the vp1-vp4 organs. In 22% of the cases, the two cells at the position of the sheath cell and es neurone express a similar level of either Elav (see vp2 in Fig. 9H), or Pros (see vp1 in Fig. 9H), or both Pros and Elav (not shown). In 6% of the es organs, only one Elav-expressing cell is detected. Finally, in the remaining 6%, the es neurone and sheath cell are both missing. This defect is always associated with the presence of an additional md neurone at the vda_{A-D}/vbp position (7 cases out of 7, see vp4 in segment A6 in Fig. 9G and vp1 in Fig. 9F). This indicates that the pIIIb cell has been transformed into an md neurone.

In some segments (n=3/31), the presence of one additional md neurone at the vda_{A-D}/vbp position could not be correlated with a defect in the number of the vp1-vp4 organ cells (see segment A5 in Fig. 9G). We interpret this phenotype as a cell fate transformation in the lineage of the Cut-positive precursor cell detected anteriorly to vp1, which would generate two md neurones in *insc* mutant embryos. Consistent with this hypothesis, *insc-lacZ* is expressed in this lineage (data not shown).

In conclusion, our data show that the loss of *insc* activity results in cell polarity defects in the pIIb cell, as revealed by the mislocalisation of Miranda at metaphase. This phenotype correlates with the abnormal accumulation of Pros into the apical pIIb daughter cell and with the mis-specification of the pIIIb cell.



DISCUSSION

A novel model for the mono-innervated md-es lineage

We have described the complete lineages generated by the five vp1-vp4a SOPs. Prior to this study, the vp1-vp4 lineages were considered to be of the solo-es type, while the vp4a lineage was described as an md-es lineage (Brewster and Bodmer, 1995). In contrast to this classification, our analysis reveals that the same lineage applies to the five ventral papilla. We confirm that the vp4a lineage produces the vdaa md neurone and we propose that the vp1-vp4 lineages generate four of the five vdaA-D/vbp neurones. The four md neurones produced by the vp1-vp4 SOPs are likely to be the vdaA-D neurones since embryos carrying deletions for the Achaete-scute Complex (ASC) lack all four vp1-vp4 es organs together with the four vdaA-D md neurones, while the vbp neurone remains unaffected (Dambly-Chaudière and Ghysen 1986). This indicates that the vbp neurone is produced by an unrelated lineage. Our data suggest that the vbp neurone is produced by the asymmetric division of a precursor cell found anteriorly to the vp1 cells.

We propose a novel model for the mono-innervated es-md lineage, in which each pI cell undergoes a series of four asymmetric divisions to generate the four es cells and one md Fig. 9. Insc regulates the fates of the pIIb daughter cells. (A-F) Stage 16 wild-type (A,E) or *insc* mutant (B-D,F) embryos are stained for Cut (in red), Elav (in blue) and β -galactosidase (E7-2-36; in green). (A-D) At the vp4a position, a single vdaa neurone is seen together with the four vp4a cells in wild-type embryos (A), whereas various defects may be observed in insc mutant embryos (B-D): a loss of the vp4a es neurone and sheath cell accompanied by a duplication of the vdaa md neurone (B); a single Elav-positive cell seen at the position of the vp4a es neurone and sheath cell (C); or the presence of two pIIIb daughter cells accumulating Elav (D). In contrast, the socket and shaft cells were always correctly specified (B-D). Asterisks indicate vp4 organ cells. (E,F) In wild-type embryos (E), five vda_{A-D}/vbp neurones are detected, while in *insc* mutant embryos (F), one extra Cut-positive, Elav-positive and E7-2-36-positive cell can be observed at the position of vda_{A-D}/vbp neurones (outlined by broken circles in E and F). This phenotype is accompanied by the loss of the vpl es neurone and sheath cell (compare arrowheads pointing to the vp1 organ cells in E and F, the vp1 neurone in E was identified based on its Elay-positive dendritic extension). The Cut-negative, ASCindependent vdap md neurones are indicated by asterisks. (G) Six Cut- and Elav-positive cells were seen at the position of vdaA-D/vbp neurones in the segments A5 and A6 of a insc mutant embryos stained for Cut (in red), Pros (in green) and Elav (in blue). Broken circles outline the vda_{A-D}/vbp and vdaa md neurones. In the segment A6, the neurone and the sheath cell of the vp4 organ are absent (arrowheads point toward the remaining socket and shaft cells) while all vp1 to vp4a es organ cells are present in the segment A5 (arrowheads point to every cell of the vp1 to vp4a organs). The phenotype observed in the segment A6 is similar to the phenotype described in F. In contrast, the correct number of vp1-vp4 es cells is seen in the segment A5. (H) In this insc mutant embryo stained for Cut (in red), Pros (in green) and Elav (in blue), the pIIIb daughter cells accumulate equal amount of either Elav (see vp2) or Pros (see vp1). Equal accumulation of Elav in both pIIIb daughter cells is also observed in the vp4a organ of the segment A6 in G. Scale bars: in D, 3.5 µm for A-D; in E-G, 5 µm.

neurone (Fig. 10A). This model differs from the three models previously proposed for the es lineages (Fig. 10D-F). Based on BrdU incorporation, Bodmer et al. have shown that the socket and shaft cells are born from a precursor cell that replicates its DNA prior to the precursor cell that generates the neurone and the sheath cell (Bodmer et al., 1989). These observations are consistent with the lineage proposed here. However, assuming that the SOP cell generates only the four cells of the mature es organs, Bodmer et al. proposed a model where each SOP cell generates two secondary precursor pIIa and pIIb which divide once to produce the four es organ cells (Fig. 10D). In a more recent study based on the retrospective analysis of small lacZpositive FLP-out clones, Brewster and Bodmer proposed that the vp1-vp4 SOPs follow a solo-es lineage (Fig. 10D), while the vp4a SOP produces the vp4a es organ together with the vdaa md neurone (Fig. 10E; Brewster and Bodmer, 1995). This lineage differs from the solo-es lineage by the existence of an additional round of asymmetric division that produces the es neurone and the md neurone. As mentioned by the authors, this analysis did not allow to definitively conclude that the vdaa and vp4a neurones are sister cells (Brewster and Bodmer, 1995). In fact, BrdU-labelling experiments indicate that the precursor of the vdaa neurone replicates its DNA prior to the precursor cells that generate the four vp4a cells (Bodmer et al., 1989). This



Fig. 10. A novel model for the md-es lineage. (A-H) The different models that have been proposed for the sensory organ lineages in *Drosophila*. The daughter cells that specifically inherit Numb at mitosis are in red. The cells in which Notch signalling is (presumably) activated are in blue. The md-es lineage proposed here for the $vda_{A-D}/vp1-vp4$ and vdaa/vp4a organs is shown in A. This lineage is similar to the ones proposed for the adult mechanosensory bristles (Gho et al., 1999) (B) and for the larval chordotonal organs (Brewster and Bodmer, 1995) (C). In the chordotonal organ lineage, Numb segregation was deduced from the interpretation of the *numb* mutant phenotype (Uemura et al., 1989). In the mechanosensory organs of the wing margin, the glial cell can undergo at least one round of symmetrical division to generate additional glial cells (Van De Bor et al., 2000). (D) The model initially proposed for all the mono-innervated es lineage (Bodmer et al., 1989) and subsequently for the solo-es lineage generating in particular the vp1-vp4 organs (Brewster and Bodmer, 1995). (E) The model proposed for the md-es lineage, that generates the vp4a organ together with the vdaa neurone (Brewster and Bodmer, 1995). (F) The model proposed by Vervoort et al. for the md-es lineage (Vervoort et al., 1997). (H) The PNS in the abdominal segments A1-7 (adapted, with permission, from Brewster and Bodmer, 1995). The es and chordotonal organs are shown in yellow and red, respectively, while md neurones are shown in green. The number of ASC-dependent md neurones (dark green) exactly matches the number of es organs. The md neurones that remain in *AS-C* mutant embryos are in light green. These neurones are therefore thought to be produced by lineages unrelated to the es organ lineage (Dambly-Chaudière and Ghysen, 1986).

observation is consistent with the lineage proposed here, but excludes the lineage proposed by Brewster and Bodmer (Brewster and Bodmer, 1995).

More recently, Vervoort et al. revised the md-es lineage and proposed the existence of a p0 cell that would divide asymmetrically to give rise to an es pI cell and to an md neurone (Fig. 10F; Vervoort et al., 1997). This hypothesis was based on the lack of md neurones and on the excess of external accessory es cells in *numb* mutant embryos, and, conversely, on the excess of md neurones and lack of es neurones in *Notch* mutant embryos. These observations led Vervoort et al. to propose that the cell that inherits Numb during the postulated p0 division is the md neurone (Vervoort et al., 1997). This hypothesis is, however, not consistent with our observation that the cell receiving Numb during the first division undergoes two additional rounds of cell division. As discussed below, the model proposed here can also account for these *numb* and *Notch* mutant phenotypes. Thus, together with the BrdU-labelling data presented by Bodmer et al. (Bodmer et al., 1989), our study of the vp1-vp4a lineages rules out all three previously proposed models for the md-es lineage.

The pattern of cell divisions is identical in the vp1vp4a, chordotonal and adult bristle lineages

We and others have recently proposed a novel model for the lineage of the adult mechanosensory organs in the notum (Fig. 10B; Gho et al., 1999; Reddy and Rodrigues, 1999). The direct observation of cell divisions by time-lapse microscopy has shown that each pI cell undergoes a series of four asymmetric cell divisions to generate the four cells composing one es organ as well as one glial cell (Gho et al., 1999). This lineage is strikingly similar to the one proposed here for the vp1-vp4a organs.

Moreover, the md-es lineage proposed here is also similar to the chordotonal lineage proposed by Brewster and Bodmer (Brewster and Bodmer, 1995; Fig. 10C). In this lineage, the pIIb cell divides to generate a ligament cell and a pIIIb cell, which in turn divides to generate a neurone and a scolopale cell, while the pIIa cell divides asymmetrically to produce the cap cell and an ectodermal cell.

Based on these lineage relationships, we propose that the md neurone in the md-es lineage is the homolog of the glial and ligament cells in the bristle and chordotonal lineages, respectively. Interestingly, both the glial cell in the pupa and the ligament cell in the embryo express repo and glial cells missing (gcm) (Gho et al., 1999; Halter et al., 1995; Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Reddy and Rodrigues, 1999; Van De Bor et al., 2000). Furthermore, both cells adopt a neuronal fate in gcm mutant conditions (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Van De Bor et al., 2000; Y. B., unpublished observations). Whether this transformed neurone shows the large dendritic arborisation typical of md neurones remains to be examined. We propose that each SOP follows an invariant sequence of asymmetric cell divisions, and that variations in the fate of the progeny cells depends on the combinatorial expression of proneural and selector genes, such as cut or gcm.

Should the other solo-es and md-es lineages be also revised?

Since the results from previous lineage studies were interpreted with the assumption that little or no cell migration occurs during PNS development, an md-es lineage could only be recognised when a ASC-dependent md neurone is located close to a es organ. Thus, four md-es pairs were established: vp4a and vdaa; lh2 and lda; lp2 and ltd; and dh1 and one of the five dda_{A-E} md neurones. Similarly, an md-poly-innervated-es lineage was proposed for the following two pairs: vp5 and v'dap; dh2 and one of the five ddaA-E md neurones (Brewster and Bodmer, 1995). Here, we have established four new md-es pairs: vp1-vp4 and the four vda_{A-D} md neurones. We propose that the remaining three ASC-dependent md neurones, istd and two of the three ddaA-E neurones (Dambly-Chaudière and Ghysen, 1986), are also related by lineage to the lh1, dp1 and dp2 organs, respectively. Thus, each es organ can be associated with a ASCdependent md neurone. We therefore propose that the lineage described here for the vp1-vp4a lineages applies to all monoinnervated es organs in the embryo.

Implications for the interpretation of mutant phenotypes

Consistent with a unique md-es lineage, mutations affecting the Notch signalling pathway lead to similar transformations in all mono-innervated es organs. Based on our description of the asymmetric segregation of Numb to the pIIb cell and to the md neurone during the formation of the vp1-vp4 organs (Fig. 10A), we propose a novel interpretation of the mutant phenotypes in genes involved in the Notch pathway. Notch mutant embryos have a large excess of md neurones and a loss of es neurones and es accessory cells (Vervoort et al., 1997), which we interpret as a pIIa-to-pIIb transformation followed by a pIIIb-to-md neurone transformation. Similarly, sanpodo mutant embryos display an excess of md neurones and a loss of sheath cells, which we interpret as a pIIIb-to-md neurone transformation (Dye et al., 1998; Salzberg et al., 1994; Salzberg et al., 1997). Finally, numb mutant embryos show a complete loss of md neurones, es neurones and sheath cells, together with a doubling in the number of socket and shaft cells (Uemura et al., 1989; Vervoort et al., 1997). This phenotype can be interpreted as a pIIb-to-pIIa transformation.

The function of Insc in the md-es lineage

We have found that Insc does not accumulate in the pI cell but forms an apical crescent only in the pIIb cell. This contrasts with previous studies suggesting that the insc gene is expressed in pI (Knirr et al., 1997; Kraut and Campos-Ortega, 1996). These studies, however, did not rely on double labelling experiments to identify the pI cell. Therefore, it is possible that pIIb cells might have been mistaken for pI cells. Consistent with this observation, we found that the polarity of the pI cell division does not depend on the activity of the insc gene (see also Schober et al., 1999). In contrast, the asymmetric division of pIIb, which is polarised along the apical-basal axis, depends on the *insc* activity. During the division of pIIb, Pros, Miranda, Numb and Pon specifically segregate to the basal md neurone. Using Miranda as a marker for cell polarity, we have shown that the *insc* activity is required to polarise the pIIb cell along its apical-basal axis. As also seen in neuroblasts (Yu et al., 2000), the complete zygotic loss of *insc* function results only in a partial delocalisation of the basal Miranda crescent in the pIIb cell. Consistent with this defect in cell polarity, the unequal accumulation of Prospero in the two pIIb daughter cells is affected, and the fates of the pIIb daughter cells are not correctly specified. Indeed, the loss of insc activity can result in the pIIIb cell adopting an md fate. It can also lead to the abnormal differentiation of the pIIIb daughter cells. As Insc does not form a crescent in the pIIIb cell, this latter phenotype is probably an indirect consequence of the mis-specification of the pIIIb cell fate following the pIIb division.

Insc is known to regulate both cell polarity and cell fate decisions in several asymmetrically dividing cells in the mesoderm and in the CNS. In the dividing GMC 4.2, Numb segregates to the RP2 neurone and is required for the specification of the RP2 fate. In *insc* mutant embryos, a second RP2 neurone forms at the expense of the RP2 sib neurone, indicating that the loss of *insc* activity promotes the fate adopted by the cell inheriting Numb in wild-type embryos (Buescher et al., 1998). Similarly, in *insc* mutant embryos, we observed some pIIIb-to-md transformations but never the reciprocal md-to-pIIIb transformation, indicating that the loss of *insc* function promotes the fate of the cell receiving Numb.

Cell polarity and asymmetric divisions in the embryonic PNS

This study provides the first detailed description of each

642 V. Orgogozo, F. Schweisguth and Y. Bellaïche

asymmetric cell division in an md-es lineage. The division of the vp2-vp4a pI cell is planar and takes place with a d-v polarity, revealing for the first time the existence of a planar polarity orienting asymmetric cell divisions in the embryo. Similarly, in the pupa, the pI cell divides in the plane of the epithelium and along the a-p axis (Gho et al., 1999; Gho and Schweisguth, 1998). The polarity of this division is controlled by the Fz signalling pathway (Gho and Schweisguth, 1998). Future studies will address whether the polarity of the pI cell division of vp2-vp4a organs is controlled by similar mechanisms.

In both pupae and embryos, the pIIb cell divides with an apical-basal polarity, with Numb, Pros and Miranda segregating to the basal cell (Gho et al., 1999; V. O., F. S. and Y. B., unpublished observations). Moreover, Insc forms an apical crescent in the pIIb cell in the pupal lineage (Y. B., unpublished observation). This suggests that Insc regulates also the apical-basal polarity of the pIIb cell in the adult bristle lineage. It is clear, however, that a detailed analysis of the function of *insc* in regulating cell polarity in the adult PNS would have been much more difficult and time-consuming because *insc* mutations are embryonic lethal.

In conclusions, this study clearly illustrates that the regulation of both planar and apical-basal polarities can now be studied in the embryonic PNS. This detailed analysis therefore provides the basis for future studies addressing the function of various candidate genes known to affect the development of the embryonic PNS.

We thank B Chia, C. Gonzalez, R. Jack, Y.-N. Jan, J. Knoblich, F. Matsuzaki and the DSHB for providing various antibodies and flies. We wish to thank the Imaging facility of the Institut Jacques Monod and Gérard Géraud for use of their confocal microscope. We also thank M. Gho and R. LeBorgne for critical reading of this manuscript. This work was supported by grants to F. S. from the Centre National de la Recherche Scientifique and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 5575). V. O. was supported by the Ecole Normale Supérieure, and Y. B. was supported in part by an ARC post-doctoral fellowship.

Note added in proof

Consistent with the analogy between the pupal and embryonic es lineages documented here, Roegiers et al. have shown that the Inse protein accumulates in the pIIb cell of the adult bristle lineage, and regulates the orientation of the pIIb division in the pupa (Roegiers et al., 2001).

REFERENCES

- Bellaïche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J. A., Brand, A. H. and Schweisguth, F. (2001). Frizzled regulates the localisation of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* 3, 50-57.
- Bier, E., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. and Jan, Y. N. (1988). Identification and characterization of a neuron-specific nuclear antigen in Drosophila. *Science* 240, 913-916.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E. et al. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev.* 3, 1273-1287.
- Blochlinger, K., Bodmer, R., Jack, J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1988). Primary structure and expression of a product from *cut*, a locus involved in specifying sensory organ identity in *Drosophila*. *Nature* 333, 629-635.

- Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of *cut*, a protein required for external sensory organ development in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 4, 1322-1331.
- Bodmer, R., Carretto, R. and Jan, Y. N. (1989). Neurogenesis of the peripheral nervous system in *Drosophila* embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* 3, 21-32.
- Brewster, R. and Bodmer, R. (1995). Origin and specification of type II sensory neurons in *Drosophila*. *Development* **121**, 2923-2936.
- Buescher, M., Yeo, S. L., Udolph, G., Zavortink, M., Yang, X., Tear, G. and Chia, W. (1998). Binary sibling neuronal cell fate decisions in the *Drosophila* embryonic central nervous system are nonstochastic and require *inscuteable*-mediated asymmetry of ganglion mother cells. *Genes Dev.* 12, 1858-1870.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1997). Peripheral nervous system. In *The Embryonic Development of* Drosophila melanogaster, pp. 177-209. Berlin: Springer-Verlag.
- Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1986). Independent subpatterns of sense organs require independent genes of the *achaete-scute* complex in *Drosophila* larvae. *Genes Dev* 1, 297-306.
- Dye, C. A., Lee, J. K., Atkinson, R. C., Brewster, R., Han, P. L. and Bellen, H. J. (1998). The *Drosophila sanpodo* gene controls sibling cell fate and encodes a tropomodulin homolog, an actin/tropomyosin-associated protein. *Development* 125, 1845-1856.
- Gho, M. and Schweisguth, F. (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 393, 178-181.
- Gho, M., Bellaiche, Y. and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584.
- Grzeschik, N., Breuer, S., Renkawitz-Pohl, R. and Paululat, A. (1999). Molecular characterization of a point mutation in the *Drosophila inscuteable* gene. Drosophila *Information Service* 82, 27-29.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. and Technau, G. M. (1995). The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 121, 317-332.
- Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* 377, 627-630.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. and Hotta, Y. (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* 82, 1025-1036.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J. B., Nabeshima, Y., Doe, C. Q. and Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390, 625-629.
- Jack, J. and DeLotto, Y. (1995). Structure and regulation of a complex locus: the *cut* gene of *Drosophila*. *Genetics* **139**, 1689-1700.
- Jan, Y. N., Bodmer, R., Jan, L. Y., Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1987). Mutations affecting the embryonic development of the peripheral nervous system in *Drosophila*. In *Molecular Entomology*, pp. 45-56. Proceedings of a Monsanto UCLA Symposium, Steamboat Springs, Colorado, USA
- Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2000). Polarity in cell division: what frames thy fearful asymmetry? *Cell* 100, 599-602.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. Cell 82, 1013-1023.
- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H. and Brand, A. H. (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat. Cell Biol.* **2**, 7-12.
- Kania, A., Salzberg, A., Bhat, M., D'Evelyn, D., He, Y., Kiss, I. and Bellen, H. J. (1995). P-element mutations affecting embryonic peripheral nervous system development in *Drosophila* melanogaster. *Genetics* 139, 1663-1678.
- Knirr, S., Breuer, S., Paululat, A. and Renkawitz-Pohl, R. (1997). Somatic mesoderm differentiation and the development of a subset of pericardial cells depend on the *not enough muscles (nem)* locus, which contains the *inscuteable* gene and the intron located gene, *skittles. Mech. Dev.* 67, 69-81.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377, 624-627.
- Kraut, R. and Campos-Ortega, J. A. (1996). inscuteable, a neural precursor

gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev. Biol.* **174**, 65-81.

- Kraut, R., Chia, W., Jan, L. Y., Jan, Y. N. and Knoblich, J. A. (1996). Role of *inscuteable* in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50-55.
- Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1998). Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* 95, 225-235.
- Parmentier, M.-L., Woods, D., Greig, S., Phan, P. G., Radovic, A., Bryant, P. and O'Kane, C. J. (2000). Rapsynoid/Partner of Inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in *Drosophila*. J. Neurosci. 20, RC84, 1-5.
- Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (1999). A glial cell arises from an additional division within the mechanosensory lineage during development of the microchaete on the *Drosophila* notum. *Development* 126, 4617-4622.
- Rhyu, M. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491.
- Roegiers, F., Younger Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001). Two types of asymmetric divisions in the Drosophila sensory organ precursor cell lineage. *Nat. Cell Biol.* 3, 58-67.
- Salzberg, A., D'Evelyn, D., Schulze, K. L., Lee, J. K., Strumpf, D., Tsai, L. and Bellen, H. J. (1994). Mutations affecting the pattern of the PNS in *Drosophila* reveal novel aspects of neuronal development. *Neuron* 13, 269-287.
- Salzberg, A., Prokopenko, S. N., He, Y., Tsai, P., Pal, M., Maroy, P., Glover, D. M., Deak, P. and Bellen, H. J. (1997). P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics* 147, 1723-1741.
- Schaefer, M., Shevchenko, A. and Knoblich, J. A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila. Curr. Biol.* **10**, 353-362.

- Schober, M., Schaefer, M. and Knoblich, J. A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-551.
- Shen, C. P., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* 90, 449-458.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q. (1995). The Prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121, 3187-3195.
- The, I., Bellaiche, Y. and Perrimon, N. (1999). Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol. Cell* **4**, 633-639.
- Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1989). *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 58, 349-360.
- Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1991). prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*. *Cell* 67, 941-953.
- Van De Bor, V., Walther, R. and Giangrande, A. (2000). Some fly sensory organs are gliogenic and require *glide/gcm* in a precursor that divides symmetrically and produces glial cells. *Development* 127, 3735-3743.
- Vervoort, M., Merritt, D. J., Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1997). Genetic basis of the formation and identity of type I and type II neurons in *Drosophila* embryos. *Development* 124, 2819-2828.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 544-547.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W. (2000). Analysis of *partner* of inscuteable, a novel player of Drosophila asymmetric divisions, reveals two distinct steps in Inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.

Complément

L'orientation de la division de la cellule pI dans le lignage des microchètes du thorax est contrôlée par les gènes de polarité planaire. On peut donc imaginer qu'il en est de même pour la division de la cellule pI dans le lignage md-es de l'embryon. Cependant, mes observations indiquent que ce n'est pas le cas. Dans des mutants viables *frizzled* perte de fonction forts (*frizzled*^{R54}) ou dans des mutants viables *dishevelled*¹ (portant une mutation ponctuelle dans le domaine DEP qui est impliqué dans le contrôle de la polarité planaire (Boutros et al., 1998)), l'axe de la division de la cellule pI des microchètes du thorax est aléatoire (Gho et Schweisguth, 1998). Par contre, dans les embryons mutants, la polarité de la division de la cellule pI n'est pas affectée (Fig. 16). De même, dans les mutants zygotiques perte de fonction *flamingo*^{E59} (Usui et al., 1999), la polarité de la division est correcte (Fig. 16). Il semble donc que la polarité de la cellule pI dans l'embryon ne dépende pas des gènes de polarité planaire.



Fig. 16 - La polarité planaire de la cellule pI n'est pas affectée dans les mutants *frizzled*, *dishevelled* et *flamingo*. Schéma de l'orientation des divisions des cellules pI aux positions 2, 4 et 4a. L'orientation a été déterminée en mesurant l'angle entre l'axe dorso-ventral de l'embryon et un vecteur qui va du centre de la cellule en division au centre du croissant de Numb. La valeur moyenne est indiquée par la flèche et l'éccart-type par le secteur. *yw*: stock *yw* utilisé en tant que stock sauvage; *fz: frizzled; dsh: dishevelled; fmi: flamingo*.

ARTICLE 2

Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at mitosis

Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at mitosis

Virginie Orgogozo, François Schweisguth* and Yohanns Bellaïche*

Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR 8542, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France *Authors for correspondence (e-mail: schweisg@wotan.ens.fr and bellaich@wotan.ens.fr)

Accepted 20 June 2002

SUMMARY

An important issue in Metazoan development is to understand the mechanisms that lead to stereotyped patterns of programmed cell death. In particular, cells programmed to die may arise from asymmetric cell divisions. The mechanisms underlying such binary cell death decisions are unknown. We describe here a *Drosophila* sensory organ lineage that generates a single multidentritic neuron in the embryo. This lineage involves two asymmetric divisions. Following each division, one of the two daughter cells expresses the pro-apoptotic genes *reaper* and *grim* and subsequently dies. The protein Numb appears to be specifically inherited by the daughter cell that

INTRODUCTION

An important feature of animal development is programmed cell death, or apoptosis. In all apoptotic cells, cell death involves the activation of cysteine proteases known as caspases (Kaufmann and Hengartner, 2001). While the usptream regulators and dowstream targets of caspases are relatively well characterized (Kaufmann and Hengartner, 2001), the mechanisms that control the initial commitment of specific cells to undergo apoptosis during embryonic development are poorly understood.

In Drosophila, activation of programmed cell death appears to be regulated mainly at the transcriptional level. Cells fated to die during development express one or several of the four pro-apoptotic genes reaper (rpr), hid (Wrinkled, W - FlyBase) grim and sickle (skl) that are organized into a single large complex (Chen et al., 1996; Christich et al., 2002; Grether et al., 1995; Srinivasula et al., 2002; White et al., 1994; Wing et al., 2002a). The proteins encoded by these genes release the inhibition exerted by the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) on caspase activity through three distinct mechanisms. Firstly, all four pro-apoptotic proteins bind to IAPs and these interactions are thought to inhibit the binding of IAPs to caspases (Kaufmann and Hengartner, 2001; Wang et al., 1999). Secondly, Rpr and Hid have been shown to downregulate IAP protein levels by stimulating IAP polyubiquitination, therefore promoting their degradation (Holley et al., 2002; Ryoo et al., 2002; Wing et al., 2002b; Yoo et al., 2002). Thirdly, Rpr and Grim seem to inhibit global protein translation, resulting in a does not die. Numb is necessary and sufficient to prevent apoptosis in this lineage. Conversely, activated Notch is sufficient to trigger death in this lineage. These results show that binary cell death decision can be regulated by the unequal segregation of Numb at mitosis. Our study also indicates that regulation of programmed cell death modulates the final pattern of sensory organs in a segmentspecific manner.

Key words: Apoptosis, Notch, Asymmetric cell division, Cell lineage, *Drosophila melanogaster*

differential loss of short-lived proteins such as IAPs (Holley et al., 2002; Yoo et al., 2002). Given the diversity of cells entering apoptosis during *Drosophila* development, this gene complex is thought to integrate various death and survival signals. For instance, programmed cell death of salivary gland cells after pupation is induced by high ecdysone levels. In these cells, the ecdysone-bound EcR/USP nuclear receptor complex directly regulates *rpr* transcription through an essential binding site in its promoter (Jiang et al., 2000).

Cells specifically fated to die have been described in many stereotyped lineages in nematodes (Sulston et al., 1983) and insects (Bossing et al., 1996; Lawrence, 1966; Schmidt et al., 1997). However, the mechanisms underlying binary cell death decisions following asymmetric cell division are poorly understood. For instance, during C. elegans development, the NSM mother cell divides asymmetrically and generates a NSM neuron and a cell fated to die (Sulston et al., 1983). Cell death in this lineage requires the activity of the transcription factor CES-2 (Ellis and Horvitz, 1991; Metzstein et al., 1996). CES-2 is thought to activate the expression of the pro-apoptotic gene egl-1, a member of the Bcl-2 family, by repressing ces-1 expression (Metzstein and Horvitz, 1999). However, the mechanisms restricting CES-2 activity to only one daughter cell are not known. Binary cell death decisions have also been studied in the HSN/PHB cell lineage (Guenther and Garriga, 1996). The HSN/PHB neuroblast divides asymmetrically to generate an anterior daughter cell that undergoes apotosis and a posterior HSN/PHB precursor cell. During this division, HAM-1 is localized asymmetrically and is segregated into the
4678 V. Orgogozo, F. Schweisguth and Y. Bellaïche

posterior daughter cell. In *ham-1* mutants, the fate of each daughter cell is not properly specified and the anterior daughter cell frequently fails to undergo apoptosis. However, how HAM-1 regulates this cell death decision is not known (Guenther and Garriga, 1996).

We have investigated the mechanisms that regulate binary cell death decisions in the peripheral nervous system of the *Drosophila* embryo. We first describe the lineage of a ventral multidendritic neuron that we named vmd1a. We show that the vmd1a neuron is generated by a sensory organ primary precursor (pI) cell that divides asymmetrically twice. Following each division, one of the two cells expresses the proapoptotic genes *rpr* and *grim* and undergoes apoptosis. Numb is unequally inherited at each division. We show that Numb is necessary and sufficient to prevent apoptosis in this lineage whereas activated Notch is sufficient to trigger death in this lineage. This indicates that binary cell death decisions can be regulated by the unequal segregation of Numb at mitosis.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks

A yw stock was used as a wild-type stock. The Df(1)H99 line carries a deletion in the 75C region that removes the *reaper*, *hid* and *grim* genes (Chen et al., 1996; Grether et al., 1995; White et al., 1994). *numb*⁷⁹⁶, *insc*²², *N*^{ts} and *N*^{55E11} mutant alleles as well as the arm-GAL4, UAS-p35, hs-Nintra (Lieber et al., 1993) and UAS-Numb-Tmyc (Yaich et al., 1998) transgenes are described in FlyBase (http://fly.ebi.ac.uk:7081/). The CutA3-lacZ line carries a transgene expressing *lacZ* under the control of a *cut* enhancer (Jack and DeLotto, 1995). In the Df(1)H99/TM6 AbdA-lacZ, insc²² B6-2-25/CyO wglacZ, numb⁷⁹⁶/CyO wg-lacZ and hs-Nintra/CyO wg-lacZ stocks, homozygous embryos were identified by the lack of β-galactosidase staining.

Immunostaining, in situ hybridization and microscopy

Staged embryos were fixed and stained as previously described (Orgogozo et al., 2001). For the Notch loss-of-function experiment, staged Notchts1 and yw embryos (13-14.5 hours after egg laying at 19°C) were shifted to restrictive temperature (31°C) and were allowed to develop for 45 minutes at 31°C prior to fixation. For the Notch gainof-function experiment, staged hs-Nintra and yw embryos (15.5-16.5 or 17.5-18.5 hours after egg laying at 19°C) were heat-shocked 30 minutes at 37°C, then allowed to develop for 45 minutes at 19°C prior to fixation. Primary antibodies were used at the following dilutions: mouse anti-Cut, 1/1000 (DSHB); rabbit anti-Numb, 1/1000 (a gift from Y.-N. Jan); rat anti-Elav, 1/4 (DSHB); rabbit anti-Prospero, 1/1000 (a gift from Y.-N. Jan); guinea-pig anti-Senseless, 1/1000 (a gift from H. Bellen); rabbit anti- β -galactosidase, 1/2000 (Cappel). Secondary antibodies Cy3-, Cy5-, Alexa488- anti-mouse, rat or rabbit, 1/1000 were purchased from Jackson Laboratories or Molecular Probes. The DNA was stained with TOTO-3 (1/3000: Molecular Probes). For in situ detection of rpr, grim and hid transcripts, embryos were pre-hybridized and hybridized as described previously (Wilkie and Davis, 1998). Embryos were then incubated for 2 hours with preabsorbed horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep antidigoxigenin Fab fragments (1/1000; Roche) and washed in PBS + 0.1% Tween 20 (PBT). HRP activity was revealed with TSA-FITC (NEN Life Science) for 12 minutes. Embryos were washed four times for 5 minutes in PBT and HRP activity was then inhibited by a 30minute incubation in 0.3% H₂O₂ followed by five washes in PBT. Embryos were then incubated overnight at 4°C with the anti-Cut, antiβ-galactosidase and/or anti-Pros primary antibodies. After three PBT washes, embryos were incubated with secondary antibodies. The Cut signal was amplified using biotinylated anti-mouse (1/2000; Jackson Laboratories), avidin DH-biotinylated HRP complexes (Vector Laboratories), TSA-biotine (NEN Life Science) and streptavidine-Alexa 568 (Molecular Probes).

Images were collected on a Leica SP2 confocal microscope and processed using Photoshop software. Figures show the maximal projection of several confocal z-sections.

RESULTS AND DISCUSSION

The vmd1a pl cell divides asymmetrically twice to produce the vmd1a neuron

The vmd1a neuron is located within a cluster of five multidendritic (md) neurons in the ventral region of abdominal segments A1-A7 (Fig. 1A). The vmd1a neuron can be distinguished from the other ventral md neurons (vmd1-4) using the B6-2-25 enhancer-trap marker (Bier et al., 1989) (this study). The origin of this vmd1a neuron is not known. We have previously established that the vmd1-4 neurons are generated by the four vp1-4 external sensory (es) organ primary precursor (pI) cells (Orgogozo et al., 2001). Each vp1-4 pI cell follows a lineage called the md-es lineage. This lineage is composed of four successive asymmetric cell divisions that generate five distinct cells, the four cells of the es organ at the position where the pI cell has formed and one md neuron that will then migrate to the ventral md cluster (Orgogozo et al., 2001) (Fig. 1B). In the md-es lineage, the membrane-associated protein Numb is segregated into one of the two daughter cells at each cell division (Orgogozo et al., 2001; Rhyu et al., 1994). Numb establishes a difference in cell fate by antagonizing Notch in the Numbreceiving cell (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Guo et al., 1996). Because no es organ is found in the vicinity of the vmd1a neuron, this neuron is probably not generated by a md-es lineage.

Cut has proved to be a useful lineage marker for establishing the md-es lineage as it is expressed in the pI cell and in all its progeny cells (Blochlinger et al., 1990; Orgogozo et al., 2001). To determine the origin of the vmd1a neuron, we also used Cut as a marker since it accumulates in the vmd1a neuron (Fig. 1A). Our analysis shows that the vmd1a neuron stems from a pI cell that divides asymmetrically twice. This vmd1a pI cell appears as an isolated Cut-positive cell located anteriorly to the pIIapIIb cell cluster present at the vp1 position (Fig. 1C; throughout this study, precise staging was determined by counting the number of Cut-positive cells in the vp1 cluster). The vmd1a pI cell divides within the plane of the epithelium with Numb localized asymmetrically and segregating into one daughter cell (Fig. 1D and data not shown). Surprisingly, at a later stage when three cells are present at the vp1 position, only a single Cutpositive cell is detected at the vmd1a position instead of the two seen earlier. We named this cell pIIb. The pIIb cell undergoes an asymmetric division oriented along the dorsal-ventral axis of the embryo, with the cell-fate determinants Numb and Prospero (Pros) (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1995; Spana and Doe, 1995) segregating into the dorsal daughter cell (Fig. 1F and data not shown). This second division in the vmd1a lineage produces a dorsal cell with high levels of Pros and a ventral cell with low levels of Pros (Fig. 1G). The ventral cell becomes undetectable around the time when the vp1 cluster is composed of five cells (compare Fig. 1H and 1I). In contrast, the dorsal cell, marked by high level of Pros, accumulates Elav, a neuronal



marker. This cell is identified as the vmd1a neuron as it also expresses the enhancer-trap markers E7-2-36 (an md marker) and B6-2-25 (a vmd1a marker) (Bier et al., 1989) (Fig. 1I-J and data not shown). We conclude from this lineage study that the vmd1a neuron is born from a pI cell that divides asymmetrically twice to produce the vmd1a neuron and two daughter cells of unknown fate. The latter cells were named pIIa and pIIIb (Fig. 1E-G).

The plla and pllb cells die by apoptosis

A possible fate for the pIIa and pIIIb cells is death. To test this hypothesis, we analyzed the progeny of the vmd1a pI cell in embryos in which cell death is inhibited. We first studied

Partitioning of Numb determines cell death 4679

Fig. 1. Analysis of cell divisions in the vmd1a lineage. (A) Diagram of the ventral Cut-positive md neurons and es organs in segments A1-A7. Each vp1-4a organ is composed of an es neuron (large pink circular cell), a sheath cell (green) and a socket/shaft cell pair (yellow). The vmd1a and vmd4a neurons (dark purple diamond-shaped cells) can be distinguished from the vmd1-4 neurons (pink diamondshaped cells) as they express the B6-2-25 enhancer-trap marker. (B) Md-es lineage (Orgogozo et al., 2001). Numbinheriting cells are in red. (C-K) Confocal images showing the vmd1a-vp1 region. (C-D) In stage 12 CutA3-lacZ embryos (Jack and DeLotto, 1995) stained for βgalactosidase in red, Numb in green and DNA in blue, the vmd1a pI cell divides asymmetrically soon after the vp1 pI cell has divided. (E) Stage 12 wild-type embryo stained for Cut in red, Numb in green and DNA in blue. (F-H) Stage 13 wild-type embryo stained for Cut in red, Pros in green and DNA in blue. A small Cut-positive dot is detectable at the pIIa position (arrowhead in F). (I) Late stage 13 wild-type embryo stained for Cut in red, Pros in green and Elav in blue. (J) Late stage 13 B6-2-25 embryo stained for Cut in red and β-galactosidase in green. (I-J) Cells of the vp1 lineage are indicated by a bracket. (K-K') Same confocal section of a stage 13 CutA3-lacZ embryo stained for Cut (K,K') in red and ß-galactosidase (K') in green. A small Cut-positive and some β -galactosidase-positive dots are detectable at the position of the pIIa cell (arrowhead in K, K'). In all figures, anterior is left and dorsal is up

embryos homozygous for a deficiency (H99) that removes the rpr, hid and grim genes (Chen et al., 1996; Grether et al., 1995; White et al., 1994). In these mutant embryos, one additional es organ comprising four Cutpositive cells is found near the vmd1a neuron in all segments analyzed (100%, *n*=47 segments, Fig. 2A,D). We next examined embryos expressing the caspase inhibitor p35 ubiquitously (arm-Gal4 UAS-p35 embryos). Again, an ectopic es organ was observed close to the vmd1a neuron in many segments (40%, n=52, Fig. 2C,D). Since the vmd1a pI cell is the only Cut-positive pI cell identified in this region, we conclude that the ectopic Cut-positive es cells originate from the vmd1a lineage. Hence, we infer that the pIIa and pIIIb cells in the vmd1a lineage die via apoptosis (Fig. 2E). Consistently, TUNEL-positive nuclear fragments as well as β -galactosidase-positive cytoplasmic fragments of CutA3-lacZ-expressing cells were observed at the position of the pIIa and pIIIb cells (arrowheads in Fig. 1F, K-K'; data not shown). We interpret these fragments as the nuclear and cytoplasmic remnants of the two dying cells.

In the md-es lineage, the pIIa and pIIIb cells generate the shaft/socket and the neuron/sheath cell pairs, respectively. In the absence of apoptosis, we observed that the pIIa and pIIIb cells in the vmd1a lineage generate ectopic shaft/socket and neuron/sheath cell pairs. We conclude that in the absence of apoptosis, the vmd1a lineage is completely transformed into an md-es lineage.

All abdominal Cut-positive md neurons that are not associated with any es organs are generated by a similar apoptotic lineage

Interestingly, the apoptotic lineage described above and the



Fig. 2. Genetic evidence for cell death in the vmd1a lineage. (A-C) Ventral Cut-positive md neurons and es organs in segments A1-A7 of wildtype (A), Df(1)H99 (B) and *arm-Gal4 UAS-p35* (C) embryos stained for Cut (red), Elav (blue) and Pros (green). (D) Diagram of the ventralmost Cut-positive md neurons and es organs in segments A1-A7 of Df(1)H99 or *arm-Gal4 UAS-p35* embryos. The Cut-positive md neurons (diamond-shaped cells) are either highly Cut-positive (pink) or weakly Cut-positive (light purple). Es neurons, sheath cells and socket/shaft cell pairs are as in Fig. 1A. One ectopic es organ (bold outline in D) is observed near the vmd1a neuron in Df(1)H99 (B) and *arm-Gal4 UAS-p35* (C) embryos. This es organ is composed of one Elav-positive es neuron (arrow), one Pros-positive sheath cell (arrow) and two Cut-positive cells identified as the socket and shaft cells (arrowheads; one of these two cells accumulates Suppressor of Hairless [Su(H)], a socket cell marker; data not shown (Gho et al., 1996)). This phenotype is observed in 40% of the segments of *arm-Gal4 UAS-p35* embryos (*n*=52). In other segments, we observed three Cut-positive cells (12%), two Cut-positive cells (12%) or no additional Cut-positive cell (36%). Therefore, in these cases, the level of p35 accumulation may not be high enough to fully inhibit apoptosis in the vmd1a lineage. (E) Model proposed for the vmd1a lineage. The pIIa and pIIIb cells die.



md-es lineage probably account for the production of all embryonic Cut-positive md neurons. Indeed, most Cut-positive md neurons can be associated to one es organ, suggesting that they originate from a md-es lineage. However, two or three single Cut-positive md neurons in the dorsal region of segments A1-A7 (mean value = 2.6, n=33 segments, Fig. 3A-A') cannot be associated with any es organ, similarly to the vmd1a neuron. Remarkably, in embryos homozygous for the H99 deficiency, we observed two or three ectopic es organs in the dorsal region of segments A1-A7 (mean value = 2.9, n=20, Fig. 3B-

Fig. 3. Additional apoptotic lineages similar to the vmd1a lineage in other embryonic regions. (A-D') Cut-positive md neurons and es organs in the dorsal region of segments A1-A7 (A,B) and in the ventral region of segment A8 (C,D) of wild-type (A,C) and Df(1)H99 (B,D) embryos stained for Cut (red), Elav (blue) and Pros (green). The schematic representations of the Cut-positive md neurons and es organs (A',B',C',D') are as in Fig. 2. Two or three ectopic es organs are observed in the dorsal region of segments A1-A7, as well as five ectopic es organs in the ventral region of segment A8. Arrowheads indicate the ectopic socket and shaft cells. Cells shown into brackets in A',B' are present in 58% of the segments of wild-type embryos (A': n=33) and in 90% of the segments of Df(1)H99 embryos (B'; n=20). Ectopic cells in B' and D' have a bold outline. (E) Ventral region of segments A7-A8 of a wild-type stage 12 embryo stained for Cut (red) and the sensory organ marker Senseless (Sens: blue (Nolo et al., 2000)). (E') Schematic representation of the Cutpositive and Sens-positive sensory organ precursor cells (yellow) and of the chordotonal (ch) organ precursor cells (blue) which are Cut-negative and Sens-positive. At this stage, six pIIa-pIIb cell clusters are seen in the ventral region of segment A7. In the ventral region of segment A8, five pIIa-pIIb cell clusters are observed at positions corresponding to the vmd1a, vp1, vp2, vp4 and vp4a positions in segment A7.



B'). This strongly suggests that these Cut-positive md neurons originate from an apoptotic lineage as the one described for vmd1a. Thus, all abdominal Cut-positive md neurons likely originate either from an apoptotic lineage as the one described for vmd1a or from an md-es lineage. We conclude that regulation of cell death specifies the relative number of Cut-positive md neurons and es organs within a segment.

Programmed cell death modulates the final pattern of sensory organs in a segment-specific manner

In the ventral region of segment A8, five Cut-positive md

Partitioning of Numb determines cell death 4681

Fig. 4. Numb inhibits the Notch-mediated expression of rpr and grim in the vmd1a lineage. (A-D) Wild-type embryos stained for Cut in red, Pros in blue and *rpr* transcripts (A,C) or *grim* transcripts (B,D) in green. The rpr and grim genes are specifically expressed in the pIIa and pIIIb cells of the vmd1a lineage. No expression is seen in the vp1 lineage cells. (E-F) In numb⁷⁹⁶ mutant embryos stained for Cut in red and rpr in green, rpr transcripts accumulate in both vmd1a pI daughter cells (E) or in the only pI daughter cell remaining (F). No expression is seen in the vp1 lineage cells. This indicates that both vmd1a pI daughter cells undergo cell death in the absence of numb (F'). (G) In arm-Gal4 UAS-numb embryo stained for Cut in red, Pros in green and Elav in blue, four Cut-positive cells accumulating various levels of Pros and Elav can be observed at the vmd1a position, suggesting that the pIIa cell did not die and was transformed into a pIIb cell (G'). Note that in G, the pIIa cell of the vp1 lineage was not completely transformed into a pIIb cell since two Pros-negative cells accumulating high levels of Cut, corresponding to socket-like and shaft-like cells, are observed. (H-I') B6-2-25 (H) and B6-2-25 insc²² mutant embryos (I) stained for Cut in red, β -galactosidase in green and Elav in blue. In the ventral md cluster of insc22 mutant embryos (I), six md neurons instead of the five seen in wild-type (H) are found. Two of them express the vmd1a-specific enhancer-trap marker B6-2-25. This indicates that the pIIIb cell did not die and was transformed into a vmd1a neuron (I'). (J,K) Heat-shocked hs-Nintra embryos stained for Cut in red and rpr (J) or grim (K) in green. rpr (J) or grim (K) transcripts accumulate in both pI (J) and pIIb (K) daughter cells. This indicates that in these conditions, both pI (J') or pIIb (K') daughter cells undergo cell death. Staged hs-Nintra and control yw embryos (15.5-16.5 or 17.5-18.5 hours after egg laying at 19°C) were heat-shocked 30 minutes at 37°C, to induce the expression of Nintra, and allowed to develop for another 45 minutes at 19°C prior to fixation. We only analyzed embryos in which at least one segment shows a dividing vp1 pIIb cell or a dividing vp1 pIIIb cell. In each panel, the vp1 lineage cells are indicated by a bracket.

neurons are found (100%, n=14, Fig. 3C). By contrast to segments A1-A7, no external sensory organs are observed in this ventral region. To test whether each of the five ventral A8 md neurons is generated via an apoptotic lineage similar to the one described for vmd1a, we analyzed the ventral region of segment A8 in embryos homozygous for the H99 deficiency. Remarquably, five ectopic es organs (100%, n=11, Fig. 3D-D') were observed in this region. These data indicate that five pI cells follow an apoptotic lineage similar to the vmd1a lineage in the ventral region of segment A8.

Furthermore, analysis of wild-type stage 12 embryos (Fig. 3E-E') showed that five Cut-positive pI cells form in the ventral region of segment A8 at positions corresponding to the vmd1a, vp1, vp2, vp4 and vp4a pI cells in segments A1-A7. We therefore assume that these A8 pI cells are homologous to the vmd1a, vp1, vp2, vp4 and vp4a pI cells of segments A1-A7. Together, these observations indicate that the main difference in sensory organ patterns in the ventral region between segment A8 and segments A1-A7 is that the pI cells at positions 1, 2, 4 and 4a follow an apoptotic lineage in segment A8 and an mdes lineage in segments A1-A7. A recent study has revealed that the homeotic Ultrabithorax (Ubx) gene acts at different steps in sensory organ development to regulate the bristle pattern in the thoracic legs (Rozowski and Akam, 2002). Indeed, Ubx was shown to control the absence of two particular bristles in the third thoracic segment relative to the second thoracic segment by two distinct mechanisms. For the posterior

4682 V. Orgogozo, F. Schweisguth and Y. Bellaïche

				% segments showing the following outcome in the vmd1a lineage				
	Genotype			00	0•	••	0	•
Α	уw	rpr	(<i>n</i> =134)	25	71	0	4	0
		grim	(<i>n</i> =53)	8	77	0	15	0
	numb ⁷⁹⁶	rpr	(<i>n</i> =55)	13	16	54	4	13
		grim	(<i>n</i> =54)	13	26	52	0	9
	yw + HS	rpr	(<i>n</i> =98)	32	51	0	17	0
		grim	(<i>n</i> =60)	40	40	0	20	0
	hs-Nintra +HS	rpr	(<i>n</i> =61)	21	43	6	20	10
		grim	(<i>n</i> =67)	21	46	6	25	2
В	yw	rpr	(<i>n</i> =55)	6	78	0	16	0
		grim	(<i>n</i> =78)	6	91	0	3	0
	yw + HS	grim	(<i>n</i> =86)	4	90	0	6	0
	hs-Nintra +HS	grim	(n=89)	13	62	7	13	5

Table 1. Expression of the	rpr and grim genes in	n the vmd1a lineage cells
	ip: and grow genes	

The expression of the *rpr* and *grim* genes was analyzed following the division of the pI (upper part of the table, A) and pIIb (lower part of the table, B) cells in the vmd1a lineage. +HS means that embryos were heat shocked. *n* is the number of segments analyzed for each genotype. $\bigcirc\bigcirc$, two cells, neither of which expresses *rpr* or *grim*; \bigcirc , two cells, one of which expresses *rpr* or *grim*; \bigcirc , two cells, both expressing *rpr* or *grim*; \bigcirc , one cell that does not express *rpr* or *grim*; \bigcirc one cell expressing *rpr* or *grim*.

sternopleural bristle, *Ubx* blocks the selection of the pI cell from the proneural cluster whereas for the apical bristle, it inhibits the differentiation of the pIIa and pIIb cells. Our analysis suggests that homeotic genes may also regulate the final pattern of sensory organ by a third mechanism, i.e. by regulating the programmed cell death of the pIIa and pIIIb cells. Since *Abdominal-B* (*Abd-B*) regulates the homeotic identity of segment A8 (Kuhn et al., 1992), we propose that *Abd-B* regulates cell death in sensory organ lineages in segment A8. It remains to be determined whether *Abd-B* acts in the proneural cluster or in the pI cell to specify its lineage or whether it more directly regulates the expression of proapoptotic genes in the pIIa and pIIIb cells.

The vmd1a plla and pllb cells specifically express the *reaper* and *grim* genes

Since the rpr, hid and grim genes are included in the H99 region required for cell death in the vmd1a lineage, we analyzed their expression in this lineage. We found that rpr and grim, but not hid, are expressed specifically in the pIIa and pIIIb cells of the vmd1a lineage. By contrast, these genes are not expressed in cells of the vp1-4 lineages. In embryos in which a pIIb cell divides at the vp1 position in at least one abdominal segment, most segments contain a vmd1a pIIa-pIIb pair with one cell expressing rpr (71%, Fig. 4A; Table 1) or grim (77%, Fig. 4B; Table 1). This cell is the pIIa cell fated to die. In some other segments, neither of these two cells accumulates rpr (25%) or grim (8%). Since the development of segments is not perfectly synchronous, we assume that this represents a situation preceding the onset of rpr and grim expression in the pIIa cell. In the remaining segments, a single Cut-positive cell is detected indicating that the pIIa cell has died. In those segments, expression of rpr and grim is never detected in the remaining pIIb cell (Table 1).

We next analyzed the expression of *rpr* and *grim* in the pIIb daughter cells. In embryos in which at least one abdominal segment shows a dividing vp1 pIIIb cell, most segments contain a pIIIb-md pair with the ventral pIIIb cell (identified by a low level of Pros accumulation) expressing *rpr* (78%, Fig. 4C; Table 1) or *grim* (91%, Fig. 4D, Table 1). In some segments (6%), the expression of *rpr* and *grim* is not detected in the pIIIb and md cells. These segments are probably at a stage preceding

the onset of *rpr* and *grim* expression. Finally, we also observed segments with no pIIIb cell and only one highly Pros-positive cell that does not express *rpr* or *grim*, corresponding to the vmd1a neuron (Table 1). Thus, induction of apoptosis in the pIIa and pIIIb cells involves the transcriptional activation of the *rpr* and *grim* genes specifically in these cells.

Numb prevents apoptosis in the vmd1a lineage

During the pIIb division, Numb was shown to segregate into the dorsal pIIb daughter cell. This cell is not fated to die and differentiates as a vmd1a neuron. By contrast, we could not directly determine which one of the two pI daughter cells inherits Numb. Indeed, since the orientation of the vmd1a pI cell division is random, we could not identify the pIIa and pIIb cells from their relative positions. Nevertheless the vmd1a pIIa and pIIIb cells appear to generate ectopic shaft/socket and neuron/sheath cell pairs when cell death is prevented. In the md-es lineage, these cell pairs are the progeny of the cells that do not inherit Numb (Fig. 1B). This suggests that both the vmd1a pIIIb cell and the pIIa cell do not inherit Numb. Thus, Numb appears to segregate in the cells that do not die in the vmd1a lineage.

We therefore tested the role of Numb in regulating rpr and grim expression as well as cell death in the vmd1a lineage. In numb mutant embryos in which a secondary precursor cell divides at the vp1 position in at least one abdominal segment, we observed that the two Cut-positive vmd1a pI daughter cells accumulate rpr or grim transcripts (54% of the segments for rpr, 52% for grim; Fig. 4E, Table 1). In other segments we observed a single Cut-positive pI daughter cell accumulating rpr (13%) or grim (9%, Fig. 4F, Table 1). In these segments one pI daughter cell has already died and the other one is undergoing apoptosis. These two phenotypes are not seen in wild-type embryos. Thus, in the absence of numb, both pI daughter cells undergo programmed cell death. Consistently, no Cut-positive cell is observed at the vmd1a position in numb mutant embryos in most segments (19/23). We conclude that *numb* is required to inhibit the expression of *rpr* and *grim* and to prevent cell death in the pIIb cell.

To test whether *numb* is sufficient to prevent cell death, we analyzed the progeny of the vmd1a pI cell in arm-Gal4 UAS-numb embryos that express high levels of Numb. In wild-type



Partitioning of Numb determines cell death 4683 Fig. 5. Regulation of cell death in the

Fig. 5. Regulation of cell death in the vmd1a lineage. Alternative cell death decision is regulated by the unequal partitioning of Numb. Numb inhibits the pro-apoptotic function of Notch in one of the two daughter cells, while activation of Notch induces the expression of *rpr* and *grim* in the other cell.

embryos in which a vp1 pIIIb cell is dividing in at least one segment, one or two Cut-positive cells are observed at the vmd1a position (Table 1). In contrast, four Cut-positive cells are observed in 50% of the segments (n=18) in arm-Gal4 UAS-numb embryos at the same stage. In 8 out of the 9 segments with four cells, two cells accumulating high levels of Pros and two cells accumulating low levels of Pros are seen (Fig. 4G), suggesting that these cells are two vmd1a neurons and two pIIIb cells. These data indicate that the pIIa cell death was inhibited and that the pIIa cell was transformed into a pIIb-like cell (Fig. 4G').

To test whether physiological levels of Numb are sufficient to inhibit apoptosis, we used the *inscuteable* (*insc*) mutation that disrupts the polarity of the pIIb cell in the md-es lineage (Orgogozo et al., 2001). In the vmd1a lineage, Insc specifically accumulates in the pIIb cell where it localizes asymmetrically (data not shown). In *insc* mutant embryos, a duplication of the vmd1a neuron was seen in 13% of the segments (n=77, Fig. 4H,I). This indicates that the pIIIb cell has survived and was transformed into a second vmd1a neuron. We interpret this cell-fate change as resulting from a mispartitioning of Numb which then inhibits the death of the pIIIb cell (Fig. 4I'). Together, these results show that *numb* is both necessary and sufficient to inhibit cell death in the vmd1a lineage.

Activated Notch triggers apoptosis in the vmd1a lineage

Numb is known to function by antagonizing Notch activity (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Guo et al., 1996). This therefore suggests that Notch promotes cell death in the vmd1a lineage and that Numb blocks this activity of Notch. Unfortunately, the strong effect of Notch loss-of-function alleles on the selection of the vmd1a pI cell meant that it was not possible to test directly whether Notch is required for cell death in the vmd1a lineage. We therefore used the conditional Notch^{ts1} allele. However, when Notch^{ts1} embryos are shifted to a restrictive temperature (31°C) soon after the specification of the vmd1a pI cell (i.e., at 13-14.5 hours after egg laying at 19°C), we observed no significant reduction in the number of rpr- or grim-expressing pIIa cells. A stronger Notchts1/ Notch^{55e11} combination causes the appearance of additional vmd1a pI cells even at the permissive temperature (19°C). It is therefore not possible to determine whether an increase in the number of rpr- or grim-negative cells results from a lack of Notch-dependent apoptosis or from an excess of vmd1a pI cells due to reduced Notch signaling during lateral inhibition.

We therefore tested whether an activated form of Notch, Nintra (Lieber et al., 1993), can promote the death of the pIIb cell when expressed around the time of the vmd1a pI cell division. In 6% of the segments (n=128) from embryos in which at least one segment shows a dividing vp1 pIIb cell, *rpr* or *grim* transcripts accumulate in both vmd1a pI daughter cells (Fig. 4J; Table 1). In other segments, a single Cut-positive cell remains at the vmd1a position and accumulates rpr (10%, n=61 segments) or grim (2%, n=67 segments, Table 1). These expression patterns are not seen in heat-shocked control embryos (Table 1). Importantly, these observations are similar to those made in *numb* mutant embryos. Thus, both loss of *numb* activity and ectopic Notch signaling lead to transcriptional activation of pro-apoptotic genes in the pIIb cell (Fig. 4J'). Finally, a similar effect of Nintra on *rpr* and *grim* expression was seen in the vmd1a pIIb daughter cells when Nintra expression was induced at a later stage, i.e. when the vmd1a pIIb cell is dividing (Fig. 4K-K'). Together, these results indicate that Notch signaling is sufficient to promote cell death in the vmd1a lineage.

Studies in vertebrates have shown that Notch activation can either protect cells from death or trigger apoptosis depending on the cellular context (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Deftos et al., 1998; Ohishi et al., 2000; von Boehmer, 1999). The mechanisms by which Notch regulates apoptosis in vertebrates are poorly understood. We show here that Notch activation triggers the transcriptional activation of the pro-apoptotic genes reaper and grim. Activated Notch acts as a transcriptional co-activator for Supressor of Hairless (Su(H)), a sequence-specific DNA-binding protein (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). In the vmd1a lineage, activated Notch possibly regulates the rpr and grim gene expression directly via the putative Su(H)-binding sites present in the 5' and 3' flanking regions of the rpr and grim genes. Identification of the functional Su(H) binding sites located within this 300 kb gene complex is a difficult task since none of the available rpr- and grim-containing cosmids (Chen et al., 1996; White et al., 1994) include all the regulation sequences required for expression of rpr and grim in the vmd1a lineage (data not shown).

Importantly, Nintra does not induce the expression of *rpr* and *grim* in the vp1-4 lineages. Thus, depending on the cell lineage, Notch activity can either have no influence on cell death (vp1-4 lineage) or induce cell death (vmd1a lineage). A better understanding of the mechanisms underlying binary cell death decisions will require the identification of the factors influencing Notch decision in a lineage-specific manner.

In summary, we have described the lineage generating the vmd1a neuron. This lineage is composed of two asymmetric divisions following which one daughter cell undergoes apoptosis. These two binary cell death decisions are regulated by the unequal segregation of Numb at mitosis. Therefore, our data provide the first experimental evidence that alternative cell death decision can be regulated by the unequal segregation of a cell fate determinant (Fig. 5). The conserved role of Numb and Notch in neuronal specification in flies and vertebrates suggests that Numb-mediated inhibition of Notch may play a similar role in regulating cell death decisions in vertebrates.

4684 V. Orgogozo, F. Schweisguth and Y. Bellaïche

We thank J. Abrams, H. Bellen, R. Bodmer, W. Chia, R. Jack, Y.-N. Jan and T. Lieber for providing antibodies, plasmids and flies, M. Gho, P. Fichelson, R. LeBorgne, M. Leptin and I. Stuttem for critical reading of the manuscript and valuable suggestions. Supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer, ARC 5575 (F. S.).

REFERENCES

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E. et al. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev.* 3, 1273-1287.
- Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of cut, a protein required for external sensory organ development in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 4, 1322-1331.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M. (1996). The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 179, 41-64.
- Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. and Abrams, J. M. (1996). grim, a novel cell death gene in Drosophila. Genes Dev. 10, 1773-1782.
- Christich, A., Kauppila, S., Chen, P., Sogame, N., Ho, S. I. and Abrams, J. M. (2002). The damage-responsive drosophila gene *sickle* encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from *reaper*, *grim*, and *hid. Curr. Biol.* 12, 137-140.
- Deftos, M. L., He, Y. W., Ojala, E. W. and Bevan, M. J. (1998). Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 9, 777-786.
- Ellis, R. E. and Horvitz, H. R. (1991). Two C. elegans genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* 112, 591-603.
- Gho, M., Lecourtois, M., Geraud, G., Posakony, J. W. and Schweisguth, F. (1996). Subcellular localization of Suppressor of Hairless in Drosophila sense organ cells during Notch signalling. *Development* 122, 1673-1682.
- Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K. and Steller, H. (1995). The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death. Genes Dev. 9, 1694-1708.
- Guenther, C. and Garriga, G. (1996) Asymmetric distribution of the C. elegans HAM-1 protein in neuroblasts enables daughter cells to adopt distinct fates. *Development* 122, 3509-3518.
- Guo, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17, 27-41.
- Holley, C. L., Olson, M. R., Colon-Ramos, D. A. and Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat. Cell. Biol.* 4, 439-444.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during Drosophila development. *Nature* 377, 627-630.
- Jack, J. and DeLotto, Y. (1995). Structure and regulation of a complex locus: the *cut* gene of Drosophila. *Genetics* **139**, 1689-1700.
- Jiang, C., Lamblin, A. F., Steller, H. and Thummel, C. S. (2000). A steroidtriggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during Drosophila metamorphosis. *Mol. Cell* 5, 445-455.
- Kaufmann, S. H. and Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* **11**, 526-534.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377, 624-627.
- Kuhn, D. T., Sawyer, M., Packert, G., Turenchalk, G., Mack, J. A., Sprey, T. E., Gustavson, E. and Kornberg, T. B. (1992). Development of the D. melanogaster caudal segments involves suppression of the ventral regions of A8, A9 and A10. *Development* 116, 11-20.
- Lawrence, P. A. (1966). Development and determination of hairs and bristles in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae, Hemiptera). J. Cell Sci. 1, 475-498.

- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V. and Young, M. W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7, 1949-1965.
- Metzstein, M. M., Hengartner, M. O., Tsung, N., Ellis, R. E. and Horvitz, H. R. (1996). Transcriptional regulator of programmed cell death encoded by *Caenorhabditis elegans* gene *ces-2*. *Nature* 382, 545-547.
- Metzstein, M. M. and Horvitz, H. R. (1999). The C. elegans cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Mol. Cell* **4**, 309-319.
- Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in Drosophila. *Cell* **102**, 349-362.
- Ohishi, K., Varnum-Finney, B., Flowers, D., Anasetti, C., Myerson, D. and Bernstein, I. D. (2000). Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood* 95, 2847-2854.
- **Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaiche, Y.** (2001). Lineage, cell polarity and *inscuteable* function in the peripheral nervous system of the Drosophila embryo. *Development* **128**, 631-643.
- Rhyu, M. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491.
- Ryoo H. D., Bergmann A., Gonen H., Ciechanover A. and Steller H. (2002). Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by *reaper* and *ubcD1*. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 432-438.
- Rozowski, M. and Akam, M. (2002). *Hox* gene control of segment-specific bristle patterns in Drosophila. *Genes Dev.* 16, 1150-1162.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of Drosophila melanogaster. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 189, 186-204.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121, 3187-3195.
- Srinivasula, S. M., Datta, P., Kobayashi, M., Wu, J. W., Fujioka, M., Hegde, R., Zhang, Z., Mukattash, R., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et al. (2002). sickle, a novel Drosophila death gene in the reaper/ hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein. Curr. Biol. 12, 125-130.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64-119.
- von Boehmer, H. (1999). T-cell development: What does Notch do for T cells? *Curr. Biol.* 9, R186-R188.
- Wang, S. L., Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Muller, H. A. and Hay, B. A. (1999). The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* 98, 453-463.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. *Science* 264, 677-683.
- Wilkie, G. S. and Davis, I. (1998). High resolution and sensitive mRNA in situ hybridisation using fluorescent tyramide signal amplification. http://research.bmn.com. Technical Tips Online, t01458.
- Wing, J. P., Karres, J. S., Ogdahl, J. L., Zhou, L., Schwartz, L. M. and Nambu, J. R. (2002a). Drosophila sickle is a novel grim-reaper cell death activator. *Curr. Biol.* 12, 131-135.
- Wing, J. P., Schreader, B. A., Yokokura, T., Wang, Y., Andrews, P. S., Huseinovic, N., Dong, C. K., Ogdahl, J. L., Schwartz, L. M., White, K. and Nambu, J. R. (2002b). Drosophila Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for *grim-reaper* mediated apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* 4, 451-456.
- Yaich, L., Ooi, J., Park, M., Borg, J. P., Landry, C., Bodmer, R. and Margolis, B. (1998). Functional analysis of the Numb phosphotyrosinebinding domain using site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 273, 10381-10388.
- Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M., Clem, R. J., Muller, H. A., Hay, B. A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat. Cell. Biol.* 4, 416-424.

ARTICLE 3

Slit-Robo signalling prevents sensory cells

from crossing the midline in Drosophila

Slit-Robo signalling prevents sensory cells from crossing the midline in *Drosophila*

Virginie Orgogozo, François Schweisguth and Yohanns Bellaïche

(en préparation)

INTRODUCTION

A key feature of Triploblastic animals is their bilateral symmetry. In unfertilized eggs or early embryos, formation of the anterior-posterior and dorsal-ventral body axes leads to the establishment of a bilateral symmetry. Then, throughout development, bilateral symmetry is maintained in most tissues, implying that cell proliferation, differentiation, apoptosis and migration follow nearly identical patterns in the left and right halves of the developing organism.

Structures located along the midline have been shown to participate in maintaining this bilateral symmetry. In both vertebrates (fish, chick, rat, mouse) and Ecdysozoa (nematode and fly), midline cells of the central nervous system (CNS) play an essential role in providing cues that enable cells and axons to make appropriate guidance decisions in a symmetrical manner relative to the midline (reviewed in Hobert et al., 2002; Kaprielian et al., 2001; Tear, 1999). In all these species, CNS midline cells have been shown to secrete two important guidance molecules, Netrin and Slit, that act as chemoattractant or chemorepellent, depending on the cellular context, for cells, axons, and dendrites (reviewed in Dickson, 2002; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

In Drosophila, midline glial cells secrete the Netrin-A and Netrin-B proteins that attract commissural axons toward the midline and repel motor axons away from it (Harris et al., 1996; Mitchell et al., 1996). They also produce Slit, a large protein that signals through the Roundabout (Robo) family receptors, Robo, Robo2 and Robo3. Slit regulates many distinct processes in D. melanogaster (reviewed in Brose and Tessier-Lavigne, 2000; Wong et al., 2002). As a short-range repellent signalling through Robo, Slit prevents ipsilateral neurons from crossing the midline and commissural axons from recrossing it (Battye et al., 1999; Kidd et al., 1999). Slit also acts as a long-range repellent through Robo2 and Robo3 to position axons running parallel to the midline away from it (Rajagopalan et al., 2000a; Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000a; Simpson et al., 2000b). In addition to its role in axonal pathfinding, Slit/Robo signaling also regulates dendritic outgrowth (Furrer et al., 2003). Finally, Slit has been shown to regulate bilateral symmetry in tissues other than CNS. For instance, midline secreted Slit directs muscle precursor cell migration away from the midline and later repels cytoplamic extensions of the muscle cells (Kidd et al., 1999; Kramer et al., 2001). Thus, Slit signalling provides directional information, orients cell migration and directs cell extensions away or towards the source of Slit.

The *Drosophila* larval peripheral nervous system (PNS) is composed of various types of sensory organs that are patterned in a perfectly bilateral manner (Dambly-Chaudière and Ghysen, 1986; Ghysen et al., 1986). Each sensory organ originates from a primary precursor

(pI) cell that is singled out from a group of equipotent cells (Dambly-Chaudiere and Ghysen,1989; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Sensory organs are generally born in their final position. One known exception is the lateral chordotonal organ lch5, whose sensory units migrate and rotate in a process dependent on the POU-domain gene *ventral veinless* (Inbal et al., 2003). Therefore, the final pattern of sensory organs in the larva largely stems from the initial pattern of pI cells established at stages 11-12. Following its specification, each pI cell follows a series of asymmetric cell divisions to generate sensory cells (Bodmer et al., 1989; Orgogozo et al., 2001; Orgogozo et al., 2002). We show here that the pI cell appearing at position 1a, close to the ventral midline, produces progeny cells that migrate away from the midline. We investigate the role of the midline in this migration and show that the activity of the *slit* gene is required to prevent sensory cells from crossing the midline. We therefore propose that midline cells contribute to the maintenance of PNS bilateral symmetry.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks

Flies were raised at 25°C. A *yw* stock was used as a wild-type stock. The CutA3-LacZ line carries a transgene expressing *lacZ* under the control of a *cut* enhancer [Jack, 1995 #107]. The *Df(1)NP5* deficiency deletes the two *netrin* (*net*) genes *netA* and *netB* (Mitchell et al., 1996). The *slit*² allele carries a nonsense mutation at position 3150 and is considered as a null allele (Bloomington fly stock) (Battye et al., 2001). The *single-minded* (*sim*)-*Gal4* and *UAS-slit* transgenes are described in (Kidd et al., 1999; Kidd et al., 1998b). The *slit*² embryos expressing *UAS-slit* specifically at the ventral midline were produced from a *slit*², *sim-Gal4/Cyo,wg-lacZ*; *UAS-slit* stock (gift from S. Kramer). The *robo*^{GA285}, *robo2*^{X123} and *robo3*¹ alleles are considered as null ((Kidd et al., 1998a; Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000b)). The *Df(1)H99* line carries a deletion in the 75C region that removes the *reaper, hid* and *grim* genes (Chen et al., 1996; Grether et al., 1995; White et al., 1994). *slit*², *Df(1)H99* embryos were obtained from *slit*²/*Cyo,wg-lacZ*; *Df(1)H99/TM6,Tb,AbdA-lacZ* flies. In all experiments, homozygous mutant embryos were identified by the absence of β-galactosidase staining.

Immunostaining and microscopy

Staged embryos were fixed and stained as previously described (Orgogozo et al., 2002). Primary antibodies were used at the following dilutions: guinea-pig anti-Senseless, 1/1500 (gift from H. Bellen), mouse anti-Cut, 1/1000 (2B10; DSHB); rabbit anti-b-galactosidase, 1/2000 (Cappel), rat anti-Elav, 1/4 (7E8A10,DSHB), rabbit anti-Collier, 1/500 (gift from A. Vincent), mouse anti-Slit, 1/10 (C555.6D, DSHB), mouse anti-Robo, 1/10 (13C9, DSHB), rabbit anti-Robo2, 1/100 (gift from B. Dickson), mouse anti-Robo3, 1/10 (14C9, DSHB), rabbit anti-Prospero 1/1000 (gift from Y.-N. Jan) and rabbit anti-a-Spectrin, 1/1000 (gift from D. Kiehart). Images were collected on a Leica SP2 confocal microscope and processed using Photoshop software. Figures show the mean projection of several confocal z-sections. When necessary, the CNS signal detected in the bottom z-sections below the sensory cells was removed to better show the sensory cells in the z-projected images.



Fig. 1. Formation of sensory organs in the ventral region of abdominal hemisegments A1-A7. (A) Ventral view of a stage 16 wild-type embryo stained for Cut (red), Elav (blue) and Coe (green). Cut is a nuclear protein that is used as a marker of sensory cell marker (Blochlinger et al., 1990; Orgogozo et al., 2001; Orgogozo et al., 2002). Elav is an RNAbinding protein that specifically accumulates in neurons (Robinow et al., 1988). Cut, Elav and Coe are also expressed in the CNS. The five vp1-4a es organs are arranged in a semicircle, in the center of which is found the ventral md cluster. The vmd1a and vmd4a neurons express all three markers and appear in light green. The ventral midline is represented as an horizontal dashed grey line in this and following figures. Scale bar is 5 mm. (B) Diagram of the Cutpositive sensory cells shown in (A). Each external sensory organ is composed of an es neuron (pink circular cell), a sheath cell (green) and a socket/shaft cell pair (yellow). All the md neurons (diamond-shaped cells) originate from an md-es lineage except for the vmd1a neuron (diamond-shaped neuron outlined in blue) that originates from an md-solo lineage. The Coepositive vmd1a and vmd4a neurons are in light green while the other Coe-negative vmd1-4 neurons are in pink. (C) Diagram showing the relative position of the Cut-positive pI cells at late stage 11. pI cells in white follow a md-es lineage whereas those in blue follow an md-solo

lineage. Note that following germ-band retraction and dorsal closure, the epithelium is stretched along the dorsal-ventral axis (Martinez-Arias, 1993). (D,E) Cell division patterns in the md-es (D) and md-solo (E) lineages. See Orgogozo et al., 2001 and Orgogozo et al., 2002 for a detailed description of these lineages. In all figures, anterior is at left.

RESULTS

The sensory precursor cells of the vmd1a neuron (i.e. plla, pllb and their progeny cells) migrate away from the midline

In the ventral region of abdominal segments A1-7, five external sensory (es) organs are found symmetrically arranged in a semicircle on either side of the midline (Fig. 1A,B). These are the ventral papilla (vp) vp1, vp2, vp3, vp4 and vp4a (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). These five sensory organs are born at about their final position from single primary precursor cells (pI), the 1-4a pI cells (Orgogozo et al., 2001, Fig. 1C). Indeed, the relative positions of the mature vp1-4a es organs in stage 16 embryos (Fig. 1A,B) are similar to those seen in late stage 11 embryos (Fig. 1C). In a previous study, we showed that each of these 1-4a pI cells follows a multidendritic (md)-es lineage and generates five distinct cells: the four es cells and one md neuron (Orgogozo et al., 2001, Fig. 1D). While the vmd4a neuron remains closely associated with its sister cells from the vp4a es organ, the vm1-4 neurons migrate to cluster together at the center of the semicircle formed by the vp1-4a es organs (Orgogozo et al., 2001).

Another pI cell also forms in the ventral region of abdominal segments A1-7. This pI cell follows a md-solo lineage (Orgogozo et al., 2002) Fig. 1E) and produces only one md neuron called vmd1a. This neuron can be uniquely identified using the transcription factor Collier (Coe, Crozatier et al., 1996). Indeed, Coe is expressed in only three neurons in the abdominal PNS, vmd1a, vmd4a and the dorsal md neuron ddaC (M. Crozatier and A. Vincent, personnal communication). These three md neurons belong to class IV md neurons, as defined by Grueber et al (Grueber et al., 2002) (Fig. 1A,B). At stage 11 and during stage 12, the pI cells at positions 1 and 1a and their progeny cells lie close to the midline (Fig. 2A-C). At stage 13, however, their progeny cells pIIa and pIIb appear to migrate away from the midline (Fig. 2D). In particular, the sensory cell cluster at position 1a produces dorsally one long cellular extension (Fig. 2D). This cell cluster comprises the vmd1a neuron, which appears to migrate towards the centre of the semicircle where it clusters with the vm1-4 neurons (Fig. 1A,B).

Loss and duplication of the vmd1a neuron in slit mutant embryos

To investigate the putative role of the midline-secreted proteins Slit and Netrins in regulating the migration of the vmd neurons away from the midline, we analysed the position of these neurons at stage 16 in embryos of the corresponding mutant backgrounds. No defect was detectable in *netA*,*netB* double mutant embryos (n=24 segments, data not shown), indicating that Netrins are not required for the migration of the vmd neurons away from the



Fig. 2. The vmd1a neuron migrates away from the midline. (A) Position of the vp1 and vmd1a pI cells. (B-D) Ventral views of embryos expressing the CutA3-lacZ transgene and stained for Senseless (Nolo et al., 2000, red) and cytoplasmic β -galactosidase (blue). The pI cells at stage 11 (B) and the pIIa-pIIb cell pairs at stage 12 (C) are located close to the midline. At stage 13, their progeny cells appear to migrate away from the midline (D). The sensory cluster at position 1a produces a long cellular extension directed dorsally at stage 13.



Fig. 3. A variable number of vmd1a neurons in *slit* **mutant embryos.** Lateral views of stage 16 embryos stained for Cut (red), Elav (blue) and Coe (green). In wild-type embryos (A), four Coe-negative md neurons (vmd1-4) and one Coe-positive neuron (vmd1a) are detected in the ventral md cluster. In contrast, a variable number of md neurons is observed in *slit* mutant embryos. In 24% of the hemisegments, four Coe-negative md neurons and two Coe-positive neurons were detected (B). In 29% of the hemisegments, only four Coe-negative md neurons were observed (C). In the remaining 47% of the hemisegments, a wild-type situation was seen (data not shown). In *slit² sim-GAL4 UAS-slit* embryos, four Coe-negative

md neurons (vmd1-4) and one Coe-positive neuron (vmd1a) are detected in the ventral md cluster as in wild-type embryos. Note that in *slit* embryos, the semicircle is not as stretched as in wild-type embryos (Fig. 3A-C). This defect is rescued in *slit² sim-Gal4 UAS-slit* embryos (Fig. 3D). This stretching of the semicircle may be an indirect consequence of the elongation of the ventral epithelial cells along the dorsal-ventral axis throughout stages 13-14-15 (see Fig. 15 in Martinez Arias, 1993).

midline. In *slit*² embryos, the vmd neurons appeared to be properly positioned relative to the vp1-4a es organs. However, the ventral md cluster was found to comprise a variable number of md neurons, ranging from 4 (one md neuron missing in 29% of the hemisegments, n=66, Fig. 3C) to 6 (one extra md neuron in 24% of the hemisegments, Fig. 3B). Strikingly, the ventral md cluster invariably included four Coe-negative md neurons and either no, one or two Coe-positive md neurons (Fig. 3B-D). In contrast, a single Coe-positive md neuron near the vp4a organ was always present (n=66, Fig. 3B-D). This analysis indicates that Slit specifically regulates the number of Coe-positive vmd1a neurons in the ventral md cluster.

The vmd1a neuron is born from the asymmetric division of the pIIb cell in an md-solo lineage (Fig. 1E). In this lineage, the sister cell of the md neuron is a cell fated to undergo apoptosis (Fig. 1E). This led us to hypothesize that the *slit* mutant phenotype might result from defects in asymmetry of the pIIb cell that would divide to generate two daughter cells adopting the same fate, either a vmd1a neuron or an apoptotic fate. The resulting duplication and loss of the vmd1a neuron would therefore account for the observed *slit* phenotype. Consistent with this hypothesis, Slit has recently been shown to be required to establish cell fate asymmetry in the lineages of the Ganglion Mother Cells GMC-1 and GMC-1a (Mehta and Bhat, 2001). We therefore analysed the segregation of the cell fate determinant Prospero (Pros, (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1995; Spana and Doe, 1995)) during pIIb cell division. As in wild-type embryos (Orgogozo et al., 2002), Pros is always unequally partitioned at telophase in *slit* mutant embryos (n=22, data not shown). Moreover, the lineage followed by the pI cell at the position 1a is identical to the one seen in wild-type embryos ((Orgogozo et al., 2002), data not shown). This indicates that the variation in the number of vmd1a neurons is not due to a defect in pIIb asymmetry.

A second hypothesis was that the vmd1a neuron, or one of its precursor cells, has the ability to cross the midline in *slit* mutant embryos, leading to the presence of two vmd1a neurons on one side and no vmd1a neuron on the other side of the embryo. We tested this hypothesis by counting the number of Coe-positive vmd1a neurons on each side of *slit* embryos. Interestingly, when two Coe-positive vmd1a neurons were observed in one hemisegment, no Coe-positive vmd1a neuron was detected in the contralateral hemisegment (48% of the segments, Table 1). Thus, within a segment, duplication on one side is always associated with a loss on the other side. This correlation strongly suggested that the vmd1a neuron or one of its precursor cells could cross the midline in *slit* mutant embryo. We note, however, that the converse correlation is not strict. Indeed, in 10% of the segments, the loss of vmd1a in one hemisegment does not correlate with its duplication in the contralateral hemisegment but is instead associated with the presence of a single vmd1a neuron (Table 1).

				*
17142				
sli ²	42	48	10	0
sli² sim-gal4 UAS-sli	97	3	0	0
robo ^{GA285}	100	0	0	0
robo2 ^{X123}	100 ¹	0	0	0
$robo2^4$	88	6	6	0
robo ^{GA285} ,robo2 ^{X123}	43	21	12	24
robo ^{GA285} ,robo3 ¹	100 ¹	0	0	0

Table 1. The vmd1a duplication correlates with vmd1a loss in *slit* **and** *robo* **mutant embryos.** The various phenotypes seen at the ventral md cluster are shown schematically above each column. The Coe-negative md neurons are shown as pink diamond-shaped cells whereas the Coe-positive vmd1a neurons are shown as light green diamond-shaped cells. For each segment, the two clusters located on either side of the midline are shown. For each genotype, 33 segments were analysed. Numbers indicate percentages of segments showing the depicted genotypes. The results show that duplication of the vmd1a always correlates with a loss of vmd1a in *slit* and *robo2* mutant embryos as well as in *robo, robo2* double mutant embryos. Expression of *slit* at the midline in *slit sim-GAL4 UAS-slit* embryos is sufficient to rescue the *slit* mutant phentoype. Moreover, *robo* and *robo2* appear to act redundantly as receptors for Slit in this process. In *slit* and *robo2* single mutant embryos, as well as in *robo, robo2* double mutant embryos, vmd1a neurons are occasionally not detectable at the surface of the embryo. These missing vmd1a neurons have probably migrated inward towards the CNS (see discussion).

We suggest that the missing Coe-positive md neuron did not migrate away from the midline but instead clustered with CNS neurons (see discussion). Since Coe also accumulates in many CNS neurons (Crozatier et al., 1996), we could not reliably identify such non-migrating PNS cells from CNS cells within these segments. These observations therefore suggest that the vmd1a neuron or one of its precursor cells is able to cross the midline in the absence of *slit* function and that *slit* is required to prevent midline crossing.

slit prevents sensory precursor cells from crossing the midline

To directly test whether the loss and duplication of the vmd1a neuron seen in *slit* mutant embryos is due to an aberrant migration across the midline, we monitored the position

of the vmd1a neuron and of its progenitor cells in wild-type and *slit* mutant embryos. In wildtype embryos, the vmd1a pI cell was first detected at stage 11. At this stage, the vmd1a pI cell appeared to be separated from the midline by one epidermal cell (Fig. 4A,B). The distance between the midline and the sensory cells gradually increased to reach about three cell diameters at a stage when the pIIb cell has divided (Fig. 4C-D, I). Thus, the vmd1a precursor cells apparently moved or were moved away from the midline. In *slit* mutant embryos, the vmd1a pI cell was initially separated from the midline by a single epidermal cell pI cell, like in wild-type embryos (Fig. 4E,F,I). However, in 87% of the segments (n=31), the vmd1a pIIb cells were seen to cluster together at the midline (Fig. 4G,I) and their progeny cells were often seen to migrate together away from the midline in the same hemisegment (35%; n=23 segments, Fig. 4H). Thus, these data show that the vmd1a neuron is able to cross the midline in the absence of *slit* function. Noticeably, whereas sensory precursor cells contact the midline in 87% of the segments in *slit*² mutants, only 58% of the segments present a defect in vmd1a neuron positioning at stage 16. This means that sensory cells that have been in contact with the ones from the contralateral hemisegment still have the ability to detach from each other and migrate on opposite directions away from the midline later on. Based on these results, we conclude that the correlated loss and duplication of the vmd1a neuron observed in *slit* mutant is due to the aberrant migration of the vmd1a neuron and of its precursor cells towards and across the midline. Interestingly, *slit* function is apparently not required to promote migration of the vmd1a neurons away from the midline towards their final position in the ventral md cluster. We therefore propose that Slit prevents vmd1a sensory cells from crossing the midline but is not required for the migration of sensory cells away from the midline.

Midline-secreted Slit acts on sensory cells through Robo and Robo2

We then examined the accumulation pattern of Slit and of receptors of the Robo family. As shown earlier, Slit accumulates on the cell surface of all midline cells at stage 10, prior to the emergence of pI cells (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990; data not shown). Then, from stage 11 to stage 16, Slit becomes progressively restricted to a subset of midline cells residing under the epithelium on the dorsal surface of the developing CNS (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990); Fig. 5A-A' and data not shown). In addition, we observed that Slit accumulates in a punctate pattern within the ventral epithelium at stages 12-14 (Fig. 5A and data not shown). Since *slit* mRNA was not detected in ventral epidermal cells at these stages (Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990), these dots of Slit might correspond to molecules secreted by midline glial cells and endocytosed into epidermal cells.

Thus, these data suggest that midline cells secrete Slit and that Slit diffuses in the ventral epidermis and acts there to orient sensory cell migration. To test whether the *slit* vmd1a phenotype is indeed caused by the absence of midline-secreted Slit, we analysed *slit*² embryos specifically expressing *slit* in ventral midline cells using *single-minded-GAL4 / UAS-slit* constructs. As in wild-type embryos, a single Coe-positive vmd1a neuron was observed in each hemisegment of *slit*² *sim-GAL4 UAS-slit* embryos at stage 16 (Fig. 3D and Table 1). This indicates that Slit is required at the midline to prevent midline crossing.



Fig. 4. Slit prevents midline crossing by vmd1a sensory cells. (A-H) Ventral views of wildtype (A-D) and *slit²* mutant (E-H) embryos stained for Senseless (red), a-Spectrin (green) and Prospero (blue in C and G-H) in wild-type (A-D) at stage 11 (A,E), early stage 12 (B,F), late stage 12 (C,C',G,G') and stage 13 (D,H). Sensory cells from positions 1 and 1a are encircled by a dotted line. In wild-type embryos, sensory cells are progressively moved away from the midline. In the dividing pIIb cell in the right hemisegment, Prospero localizes asymmetrically at the dorsal pole (C'). In $slit^2$ mutant embryos, sensory cells from position 1a cluster at the midline during stage 12 (G) and migrate together on one side of the embryo at stage 13 (H). Note that in *slit²* mutant embryos, Prospero localizes asymmetrically in dividing pIIb cells but the crescent of Prospero appeared to be randomly oriented (G', n=31). Since the dividing pIIb cells are always located closer to the midline than in wild-type and often in contact with the sensory precursor cells from the contralateral side (86%, n=28 dividing pIIb cells), we propose that this cell polarity defect is due to an abnormal contact between the dividing pIIb cell and the adjacent sensory cells from the contralateral hemisegment. Consistently, cell contacts between the pIIa and pIIb cells, have previously been shown to regulate orientation of the pIIa cell division (Le Borgne et al., 2002). (I,J) Plots showing the number of epidermal cells located between sensory cells and the ventral midline from stage 11 to late stage 13 at positions 1a (I) and 1 (J) for wild-type and $slit^2$ mutant embryos. Each point is the mean of at

least 10 cases; bars show standard deviation. Developmental stages are: a, pI; b, dividing pI cell; c, pIIa-pIIb cell pair; d, dividing pIIb cell; e,e', dividing pIIa cell at position 1; f,f', md-pIIIb-socket-shaft cell cluster at position 1; g', dividing pIIIb cell at position 1; h', post-mitotic five-cell cluster. Note that in *slit* mutant, sensory precursor cells from position 1 do not cross the midline. This difference between position 1 and 1a in *slit* mutant is not due to the presence of a non-apoptotic pIIa cell or its progeny at position 1. Indeed, in the absence of pIIa apoptosis, the precursor cells at position 1a are still observed to cross the midline in *slit*, *H99* double mutants (data not shown).



Fig. 5. Accumulation pattern of the proteins Slit, Robo and Robo2. (A,A') Same ventral view of a CutA3-lacZ embryo at stage 12 stained for Senseless (red), cytoplasmic β -galactosidase (blue) and Slit (green). Slit is detected in dots in the epidermal cell layer. (B,C) Ventral views of wild-type embryos at stage 12 stained for Senseless (red) and either Robo (green in B) or Robo2 (green in C). Each sensory cell is indicated by a dotted line.

Slit is the ligand for receptors of the Robo family. The *D. melanogaster* genome encodes three Robo receptors: Robo, Robo2, Robo3. These three receptors are known to accumulate on specific longitudinally projecting growth cones and axons at stages 11-16 (Kidd et al., 1998a; Kidd et al., 1998b; Rajagopalan et al., 2000a; Rajagopalan et al., 2000b). In addition, epidermal cells have been shown to accumulate low levels of Robo (Kidd et al., 1998a; Kidd et al., 1998b). Here, we confirm and extend these findings by showing that both Robo and Robo2 accumulate in epidermal cells, including in the ventral sensory precursor cells (Fig. 5B-C). Cortical Robo and Robo2 staining is detected from stage 11, when pI cells appear, to stage 14, when md neurons end their migration (Fig. 5B-C and data not shown). In contrast, Robo3 was not detected in the ventral epithelium at stages 11-16 (data not shown). These expression data suggest that Robo and Robo2 may mediate *slit* function on sensory cell migration in the ventral epidermis.

To test this hypothesis, we analysed the phenotypes of robo, robo2, robo3 single and double mutant embryos. In $robo^{GA285}$ and $robo2^{X123}$ single mutants and in $robo^{GA285}$, $robo3^1$ double mutants, a single Coe-positive vmd1a neuron was detected in each hemisegment (Table 1). However, in $robo^{GA285}$, $robo2^{X123}$ double mutant embryos, a vmd1a neuron loss was associated with a vmd1a neuron duplication in 21% of the segments (n=33, Table 1). This phenotype is similar to the one seen in *slit* mutant embryos. Also, 36% of the segments of $robo^{GA285}$, $robo2^{X123}$ double mutant embryos included a single Coe-positive vmd1a neuron. As proposed above for *slit* mutant embryos, we suggest that missing vmd1a neurons correspond to md neurons that failed to migrate away from the midline and clustered with CNS neurons. Thus, the overall phenotypic similarity between *slit* and *robo*, *robo2*double mutant embryos led us to conclude that Robo1 and Robo2 act redundantly as Slit receptors to prevent the vmd1a neuron precursor cell to cross the midline.

DISCUSSION

The earliest PNS defect observed in *slit* mutant embryos is the clustering at the midline of the two pairs of vmd1a pIIa/pIIb cells coming from either side of the midline at stage 12. Following division of the pIIb cells, the pair of vmd1a neurons cross the midline and migrate together towards the ventral md cluster. This leads to a correlated loss and duplication of vmd1a neurons seen in both *slit* and *robo, robo2* mutant embryos at stage 16. Thus, Slit/Robo signaling is required to prevent vmd1a sensory cells from crossing the midline but is not necessary for the oriented migration of the vmd1a neuron towards the ventral md cluster. This suggests that migrating cues other than Slit regulate the migration of the vmd1a neurons away from the midline (see below).

Noticeably, in 5% of the *slit* mutant hemisegments and in 30% of the *robo*^{GA285}, *robo3*¹ double mutant hemisegments, the loss of the vmd1a neuron on one side does not correlate with a duplication in the contralateral hemisegment (Table 1). Our analysis indicates that cells are lost following their clustering at the midline (Fig. 4H and data not shown). Thus, this loss does not result from a defect in pI specification at the 1a position or from an md-solo lineage defect. We therefore propose that some md neurons failed to migrate away from the midline and did not reach the ventral md cluster; remaining instead associated with CNS cells close to the midline. Consistently, we sometimes observed in these segments and not in wild-type

segments a neuron stained for Cut, Coe and Elav at the surface of the CNS. This neuron probably corresponds to the non-migrating vmd1a neuron.

How does Robo/Slit prevent sensory cells from crossing the midline?

Slit may prevent sensory cells from clustering and crossing the midline via at least three distinct but non-exclusive mechanisms. Firstly, Slit may silence an attractive migrating signal originating from the midline. For example, Slit has been shown to silence Netrin-mediated attraction in the *Xenopus* CNS (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). This silencing effect is mediated by a direct interaction between the cytoplasmic domains of Robo and of the Netrin receptor. To test whether Slit may similarly silence a Netrin-mediated attraction of the sensory precursor cells towards the midline, we have analyzed *slit,netA,netB* triple mutant embryos and found that these embryos showed a phenotype similar to the one seen in *slit* mutant embryos (data not shown). This therefore indicates that Slit does not act on sensory cells via Netrins.

Secondly, Slit-secreting midline cells may act as a mechanical barrier. Recent studies indicated that in *slit* mutant embryos, midline cells appear normal up to early stage 13 and then become displaced and disorganised (Kidd et al., 1999; Sonnenfeld and Jacobs, 1994). Since the earliest PNS defect is observed at early stage 13 in *slit* mutant embryos, at a stage when the organization of midline cells appears as in wild-type, this hypothesis seems unlikely.

A third and most favoured possibility is that Slit acts directly on sensory cell migration by activating the Robo signaling pathway in migrating cells. Recent data suggest that Robo receptors activate multiple parallel pathways. The tyrosine kinase Abl and its substrate Enabled have been shown to function downstream of Robo (Bashaw et al., 2000) and may act as critical effectors in regulating the dynamics of actin assembly/disassembly (Lanier and Gertler, 2000). Robo might also affect the state of actin assembly through its binding to Rho GTPase activating proteins (Wong et al., 2001). Moreover, Robo/Slit may prevent sensory cells from migrating towards the midline by regulating cell extensions during sensory cell migration. Long cellular protusions have also been observed from neurons migrating in the central nervous system in mouse (Yee et al., 1999), from migrating muscle cells in chick embryo (Knight et al., 2000) and from migrating border cells in D. melanogaster egg chamber (Fulga and Rorth, 2002). These extensions require specific DE-cadherin-mediated adhesion to the substratum to form (Fulga and Rorth, 2002). Interestingly, activation of Robo has been shown to lead to the formation of a Robo-Abl-N-cadherin protein complex (Rhee et al., 2002). As a result, β -catenin becomes hyper-phosphorylated and dissociates from N-cadherin, thus inactivating N-cadherin-mediated traction. Similarly, during sensory cell migration, a local activation of Robo at the ventral pole of the sensory cluster may inhibit the formation of cellular extensions at this pole by reducing cadherin-mediated adhesive contact.

Another signal directs the sensory precursor cells away from the midline

In 95% of the *slit* hemisegments and in 70% of the $robo^{GA285}$, $robo3^{1}$ double mutant hemisegments (Table 1), the vmd1a neuron properly migrates and reaches the ventral md cluster. This indicates that migrating cues other than Slit/Robo direct the migration of the

vmd1a neuron away from the midline. One hypothesis is that all ventral md neurons, including the vmd1a neuron, attract each other, maybe via long cytoplasmic processes, thereby leading to their clustering at the centre of the semicircle. This hypothesis is, however, not supported by our observation that, in *numb* mutant embryos, the vmd1a neuron appears to be properly positioned in hemisegments that lack the vmd1-4 neurons and where the vmd1a neuron is correctly specified (3/23, unpublished data). Alternatively, an attractive signal may be produced by cells located at the centre of the ventral region. Consistent with this hypothesis, we identified a group of specific epidermal cells that weakly express the cutA3-lacZ marker from stage 12 to late stage 13 (data not shown). The possible role of these cells in orienting the migration of the vmd neurons remains to be studied. More generally, the molecules that putatively mediate the clustering of the md neurons at this position remain to be identified.

In conclusion, our data indicate that sensory cells have the ability to cross the midline and migrate in the contralateral hemisegment during embryogenesis, which may lead to disruption of bilateral symmetry. Midline-secreted Slit prevents this cell behaviour and thus maintains PNS bilateral symmetry.

Aknowledgements

A. Vincent and M. Crozatier made the initial observation that Coe accumulates in the three class IV multidendritic neurons. We are grateful to them for sharing their unpublished work with us. We thank A. Chiba, B. Dickson, C. Goodman, S. Kramer, E. Nicolas, M.-P. Furrer and the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa University) for providing antibodies and flies.

REFERENCES

Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. and Goodman, C. S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* **101**, 703-15.

Battye, R., Stevens, A. and Jacobs, J. R. (1999). Axon repulsion from the midline of the Drosophila CNS requires slit function. *Development* **126**, 2475-81.

Battye, R., Stevens, A., Perry, R. L. and Jacobs, J. R. (2001). Repellent signaling by Slit requires the leucine-rich repeats. *J Neurosci* 21, 4290-8.

Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of cut, a protein required for external sensory organ development in wild-type and cut mutant Drosophila embryos. *Genes Dev* **4**, 1322-31.

Bodmer, R., Carretto, R. and Jan, Y. N. (1989). Neurogenesis of the peripheral nervous system in Drosophila embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* **3**, 21-32.

Brose, K. and Tessier-Lavigne, M. (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 95-102.

Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1997). The Embryonic Development of Drosophila melanogaster: Springer-Verlag.

Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. and Abrams, J. M. (1996). grim, a novel cell death gene in Drosophila. *Genes Dev* 10, 1773-82.

Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibnsouda, S. and Vincent, A. (1996). Collier, a novel regulator of Drosophila head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol* **6**, 707-18.

Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1986). The sense organs in the *Drosophila* larva and their relation to the embryonic pattern of sensory neurons. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **195**, 222-228.

Dickson, B. J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. Science 298, 1959-64.

Fulga, T. A. and Rorth, P. (2002). Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions. *Nat Cell Biol* **4**, 715-9.

Furrer, M. P., Kim, S., Wolf, B. and Chiba, A. (2003). Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat Neurosci* 6, 223-30.

Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., Aceves, E., Jan, L.-Y. and Y.-N., J. (1986). Sensory neurons and peripheral pathways in *Drosophila* embryos. *Roux's Arch. Dev.* 195, 281-289.

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

Grueber, W. B., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2002). Tiling of the Drosophila epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* **129**, 2867-78.

Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A. (1996). Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* **17**, 217-28.

Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during Drosophila development. *Nature* **377**, 627-30.

Hobert, O., Johnston, R. J., Jr. and Chang, S. (2002). Left-right asymmetry in the nervous system: the Caenorhabditis elegans model. *Nat Rev Neurosci* **3**, 629-40.

Inbal, A., Levanon, D. and Salzberg, A. (2003). Multiple roles for u-turn/ventral veinless in the development of Drosophila PNS. *Development* 130, 2467-2478.

Kaprielian, Z., Runko, E. and Imondi, R. (2001). Axon guidance at the midline choice point. *Dev Dyn* **221**, 154-81.

Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. *Cell* 96, 785-94.

Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Tear, G. (1998a). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**, 205-15.

Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S. and Tear, G. (1998b). Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20, 25-33.

Knight, B., Laukaitis, C., Akhtar, N., Hotchin, N. A., Edlund, M. and Horwitz, A. R. (2000). Visualizing muscle cell migration in situ. *Curr Biol* **10**, 576-85.

Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**, 624-7.

Kramer, S. G., Kidd, T., Simpson, J. H. and Goodman, C. S. (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* **292**, 737-40.

Lanier, L. M. and Gertler, F. B. (2000). From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 80-7.

Le Borgne, R., Bellaiche, Y. and Schweisguth, F. (2002). Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* **12**, 95-104.

Martinez-Arias, A. (1993). Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. I (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 517-608.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mehta, B. and Bhat, K. M. (2001). Slit signaling promotes the terminal asymmetric division of neural precursor cells in the Drosophila CNS. *Development* **128**, 3161-8.

Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17, 203-15.

Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in Drosophila. *Cell* **102**, 349-62.

Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaiche, Y. (2001). Lineage, cell polarity and inscuteable function in the peripheral nervous system of the Drosophila embryo. *Development* **128**, 631-43.

Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaiche, Y. (2002). Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at mitosis. *Development* **129**, 4677-84.

Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J. and Dickson, B. J. (2000a). Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* **28**, 767-77.

Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J. (2000b). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the Drosophila CNS. *Cell* **103**, 1033-45.

Rhee, J., Mahfooz, N. S., Arregui, C., Lilien, J., Balsamo, J. and VanBerkum, M. F. (2002). Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol* **4**, 798-805.

Robinow, S., Campos, A. R., Yao, K. M. and White, K. (1988). The elav gene product of Drosophila, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science* 242, 1570-2.

Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z. and Artavanis-Tsakonas, S. (1988). slit: an EGF-homologous locus of D. melanogaster involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* **55**, 1047-59.

Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S. and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* **4**, 2169-87.

Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (2000a). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* **103**, 1019-32.

Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S. (2000b). Short-range and longrange guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28, 753-66.

Sonnenfeld, M. J. and Jacobs, J. R. (1994). Mesectodermal cell fate analysis in Drosophila midline mutants. *Mech Dev* 46, 3-13.

Spana, E. P. and Doe, C. Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in Drosophila. *Development* **121**, 3187-95.

Stein, E. and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928-38.

Tear, G. (1999). Axon guidance at the central nervous system midline. *Cell Mol Life Sci* 55, 1365-76.

Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-33.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. *Science* **264**, 677-83.

Wong, K., Park, H. T., Wu, J. Y. and Rao, Y. (2002). Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 583-91.

Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L. et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-21.

Yee, K. T., Simon, H. H., Tessier-Lavigne, M. and O'Leary, D. M. (1999). Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 24, 607-22.

Commentaire

Avant de soumettre cet article, je voudrais faire quelques expériences pour essayer d'élucider les mécanismes qui distinguent le comportement des cellules précurseurs à la position 1a de ceux à la position 1.

Au stade 11, les cellules précurseurs pI des positions 1 et 1a apparaissent à la même distance de la ligne médiane!; puis dans les deux cas, leur descendance s'écarte progressivement de la ligne médiane (Fig. 2A-D). Par contre, dans les mutants *slit*, seules les cellules précurseurs de la position 1a se regroupent à la ligne médiane et la traversent (Fig. 4E-H). Comment expliquer cette différence de comportement entre les positions 1 et 1a!? Une possibilité est que les cellules précurseurs de la position 1a perdent leur ancrage dans l'épithélium suite à la mort de la cellule pIIa, qui est relativement mieux ancrée dans l'épithélium que la cellule pIIb et ses descendants (Le Borgne et al., 2002). Pour tester cette hypothèse, je voudrais faire deux expériences. Premièrement, je voudrais analyser la migration des cellules précurseurs à la position 1a en absence d'apoptose dans les mutants *slit*. Pour cela, j'ai construit un stock *slit/Cyo,wg-lacZ!; Df(1)H99/TM6,Tb,AbdA-lacZ* mais je n'ai pas encore observé le phénotype des embryons doublement homozygotes *slit Df(1)H99*. Deuxièmement, je voudrais faire l'expérience inverse, c'est-à-dire observer la migration des cellules précurseurs de sembryons doublement par apoptose dans les mutants *slit*. Pour cela, je vais analyser le segment A8 dans les mutants *slit*.

ARTICLE 4

A hidden program in *Drosophila* peripheral neurogenesis revealed:

fundamental principles underlying sensory organ diversity

A hidden program in *Drosophila* peripheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity

Eric C. Lai^{1,3} and Virginie Orgogozo^{2,3}

(en préparation)

¹ Howard Hughes Medical Institute, 545 Life Sciences Addition, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, CA 94720-3200 USA
² UMR 8542, Ecole Normale Superieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris France
³ these authors contributed equally to this work

correspondence: lai@fruitfly.org; virginie.orgogozo@normalesup.org

ABSTRACT

Insect peripheral sense organs have received particular attention as a model system for studying fundamental issues in developmental biology for over one hundred years. Different types of sensilla span an incredible range of morphological diversity, yet all are derived from stereotyped cell lineages that reproducibly generate a set of differentiated cells. Overall consideration of the classical and modern literature would appear to reveal more differences than commonalities among different insect sensory lineages. However, meticulous reassessment of several Drosophila lineages in recent years instead reveals an astonishing unity in the strategy and mechanism for producing diverse types of peripheral sense organs. Here, we review some of the history of insect lineage analyses, with particular attention to the microchaete lineage, which has undergone multiple revisions during the past few years. We then compare what has been learned from these studies with data from other new lineage analyses to reveal how diverse sensory structures in the present-day fly relate to a probable canonical ancestral lineage. We take a step further back to speculate about how such a stereotyped pattern of cell divisions may have been built during evolution, and discuss how sense organ diversity has been generated via a limited set of core lineage modifications. These include changes in terminal cell differentiation, cell death, proliferation, cell recruitment, cellcell interactions and asymmetric segregation of cell fate determinants during mitosis.

Introduction

Essential pursuits of developmental biology include understanding how cells communicate with each other, how cells are committed to survive, die, or proliferate, and how undifferentiated cells adopt terminal cell fates. These processes are key to the formation of biological patterns and thus underlie the organized development of multicellular life. The extreme morphological diversity and stereotyped development of insect external sensory organs have made them an ideal setting for studying these issues, and studies of insect sensilla have now been pursued for over a century (reviewed in Berlese, 1909).

First studies concentrated on understanding the cell complement of adult peripheral sensory organs, which are typically multicellular structures. A varying number of cells were found, with one or more sense cells bearing specialized sensory dendrites associated with one to three modified epidermal cells. Although peripheral sensory organs were generally admitted to originate from the epidermis, an early longstanding controversy concerned the nature of the sense cell. From 1909 to 1941, some authors claimed that the sense cell is prolonged by the axon of a centrally located neuron (Berlese, 1909; Haffer, 1921; Vogel, 1923; Franzl, 1921). However, other studies from this time and into the 1950s convincingly demonstrated that the same cell of an individual peripheral sensillum extends a dendrite to the periphery and projects an axon to the central nervous system, indicating that the "sense" cell and the neuron are indeed one and the same (reviewed in Bulloch and Horridge, 1965 and Bate, 1978).

Continuing studies of insect sensilla and certain homologous non-sensory structures (primarily non-innervated butterfly scales) led to the general understanding that cells of an individual sensillum are typically derived from divisions of a common progenitor cell (reviewed in Peters, 1963, Lawrence, 1966 and Bate, 1978). However, no consensus could be derived from the accumulated lineages with regards to numbers, orientations of cell division, and fates of the different cells in different sensory organs and species. Thus, it seemed possible that various peripheral sensilla may have evolved independently of each other.

Surprisingly then, studies from the last five years (including many that re-evaluated lineages that were generally believed to be well-understood) have led to the unexpected discovery of a striking concord among cell lineages that produce very morphologically distinct sensory organs in *Drosophila melanogaster*. Together, they strongly suggest that diverse sensory organs evolved from the same ancestral lineage. We investigate here the probable characteristics of this ancestral sensory lineage and propose models for the evolution of sensory lineages in *Drosophila* based upon limited modifications to the canonical lineage.

The history of the thoracic microchaete lineage

The small mechanosensory bristles, or microchaetes, that decorate the thorax of the adult fruitfly (Fig. 1A) have been a premier model system for investigating the mechanisms of cell fate determination. Their accessibility, stereotyped spatial pattern, and relatively synchronous development make their study relatively convenient. A large number of



Fig. 1. *Drosophila* **adult mechanoreceptors.** (A) Preparation of the dorsal thorax of an adult fruitfly showing the ordered array of mechanosensory bristles. The smaller bristles are referred to as microchaetes while the larger bristles are known as macrochaetes. (B) Scanning electron micrograph showing the external structures produced by two cells in the mechanosensory organ, the socket and the shaft. (C) Schemative cross section of a mechanosensory organ; the socket and shaft cells are endoreplicated and larger than the remaining internal cells of the sensillum. The Notch pathway is active in cells whose nuclei are colored red. The glial cell is shown in parentheses since it has recently been found to undergo apoptosis (see Figure 2 and text for details).

molecular markers now permit the unambiguous identification of the different cells in the sensory lineage. Together with biochemical analyses of the relevant proteins and increasingly sophisticated in vivo genetic studies, a detailed picture of the molecular and cellular events underlying bristle development has emerged.

The ontogeny of these mechanoreceptors is conceptually similar to that of most peripheral sensilla. Within a field of otherwise undifferentiated epithelial cells, groups of adjacent cells termed proneural clusters acquire neural potential due to the spatially patterned expression and activity of proneural proteins, which are basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional activators. There are two subtypes of proneural protein, the Ato class (Atonal and Amos) and the AS-C class (Achaete, Scute and Lethal of Scute); external mechanoreceptors are specified from clusters of Achaete- and Scute-expressing cells. Neural potential is subsequently restricted to a single cell in each cluster, the single sensory organ precursor (SOP), in a process mediated by the Notch (N) signaling pathway. Once stably determined, the SOP undergoes a series of asymmetric cell divisions that are also regulated by the N pathway, giving rise to the different cells comprising an individual microchaete organ. Despite of all that has been learned, fundamental descriptions of its very lineage and cell composition have undergone multiple revisions in recent years. We first consider the history of microchaete lineage analysis and trace how available techniques and thinking about the lineage have evolved over the years.

In the beginning there were four: first models of the microchaete lineage

Very primitive sensory organs may have been composed solely of specialized neurons whose cellular extensions or processes permitted them to directly sense external stimuli. Sense organs of this sort are found in cnidarians, flatworms, nemertians, rotifera, annelids and siponculids, where most types of sensilla are in direct contact with the environment and often consist simply of ciliated dendritic processes or a pit-like structure that allows exposure to the outside (Bulloch and Horridge, 1968; Wright, 1992). The evolution of additional nonneuronal support cells would have increased the sensitivity and sensing capabilities of sensory organs. For example, although some mechanoreceptors are embedded in the plane of the body wall, many others are associated with a rigid and lengthy bristle, which allows detection of physical stimuli at some distance from the body wall. In addition, support cells may have evolved in parallel with the development of the increasingly impenetrable cuticle or exoskeleton secreted by many higher invertebrates. The sockets and shafts characteristic of adult Drosophila mechanoreceptors are two such structures produced by support cells and are easily observed in the living adult (Fig. 1B) (Robertson, 1936, Lees and Waddington, 1942). Accordingly, early genetic studies focused on mutations that affected their development (Lees and Waddington, 1942). However, additional cells of the organ lie entirely beneath the cuticle, including the neuron itself (Stern, 1938, Fig 1C). Detailed studies of these cells were for many years limited by the lack of available means to specifically visualize them during development.

The first detailed descriptions of the cellular composition and lineage of adult Drosophila sensilla were undertaken by Hartenstein and Posakony (Hartenstein and Posakony, 1989). Their electron microscopy analysis indicated that microchaetes are composed of one neuron and three support cells, the socket cell, the shaft cell, and a sheath cell which enwraps the neuron (Fig. 1C). Their studies also took advantage of the observation that many support cells in the sensory lineage react with the "neuronal" marker MAb 22C10, which facilitated their identification during development. They also exploited the fact that cells in the microchaete sensory lineages are the only ones to divide and/or undergo endoreplication in the epithelium of the pupal notum. This allowed mitotic cells in the sensory lineage to be specifically labelled with BrdU, a technique used at the same time(?) to analyze sensory lineages in the embryo (Bodmer et al., 1989). They concluded that the four bristle cells derive from two successive rounds of divisions of an SOP (also referred to as pI) (Fig. 2A). A fifth cell was observed to incorporate BrdU during the lineage divisions and seen to associate with the neuronal axon, but its clonal origin could not be established by these methods. It was proposed at this time to be a glial cell of some sort and to be potentially homologous to the "soma sheath cell" of larval sensilla (Hartenstein, 1988) (Fig. 2A). However, based on the distance between it and the other daughters of the SOP, it was hypothesized that it might arise from the adepithelial cell layer, which lies basally to the epithelium proper.

Another important study by the Ghysen lab introduced a new tool, the *lacZ* enhancer trap A101 (subsequently determined to be an insertion at the *neuralized* locus (Boulianne et al., 1991)). In this genetic background, the SOP and its daughters can be specifically identified by their accumulation of β -galactosidase (Huang et al., 1991). In agreement with



Figure 2. Evolving models of the microchaete lineage. Following its selection from a proneural cluster (darkened cell in the cluster), the sensory organ precursor (pI) cell executes a fixed lineage to generate the cells of the mechanosensory organ. In all panels, cells that activate the N pathway are colored blue, where cells that do not (typically due to inheritance of Numb) are colored red. (A) In the original models proposed by Hartenstein and Posakony, pIIa divides first to generate the socket and shaft cells, then pIIb divides to generate the sheath cell and neuron. A fifth cell (the soma sheath cell) was noted to be associated with developing sense organs but not thought to be clonally related. Manipulation of N pathway activity alters

the fate of cells in the lineage. In N gain-of-function (g.o.f.) or *numb* loss of function (l.o.f.) experimental conditions, four-socket sensory organs can be observed (B), while N loss-of-function or *numb* gain-of-function conditions can result in four-neuron organs (C). (D) Subsequent model by the Schweisguth and Rodrigues labs showed that pIIb divides first to generate a glial cell and pIIIb. pIIa then divides to generate the socket and shaft cells, then pIIIb divides to generate the sheath cell and neuron. Note that pIIIb is the same cell as pIIb of panel A. (E) Revised model by the Gho lab showing that the glial cell undergoes apoptosis (X), leaving four cells in the mature sensillum.

the previous study, they observed that successive divisions of macrochaete SOPs generated four cells, but that a "fifth" A101-positive cell could be identified at many developing sense organ positions. A fifth cell was similarly noted in some developing microchaete sensory organ clusters (Usui and Kimura, 1993). However, this cell was proposed to be recruited to the developing sensory organ based on its apparently de novo expression of *lacZ* at a distance from the daughters of the SOP (Huang et al., 1991).

On the basis of these and other studies, a model for the microchaete lineage became generally accepted, in which the SOP undergoes three asymmetric divisions to generate four cells (Posakony, 1994) (Fig. 2A). Division of pI was proposed to generate two daughters, one of which (pIIa) gives rise to the two large endoreplicated cells that produce exterior structures [(the socket cell (tormogen) and shaft shaft (trichogen)] and one (pIIb) that gives rise to two subepidermal cells [the sheath cell (thecogen) and the neuron]. The existence of such a "fourcell" sensory lineage was bolstered by genetic experiments in which cell divisions in the sensory lineage could be made symmetric by altering the activity of various components in the N pathway. For each pair of sister cells in this description of the SOP lineage, one cell is a net N signal-sender, while the other is a net N signal-receiver. Excess N signaling (due to misexpression of N pathway components or loss of the N antagonist Numb) causes both daughters to adopt the fate of a signal-receiving cell, while the absence of N signaling (due to mutations in the N pathway or Numb misexpresssion) causes both to adopt the fate of a signal-sending cell. The extreme outcomes of such perturbations are four socket (Fig. 2B) and four neuron (Fig. 2C) sensory organs, respectively (Hartenstein and Posakony, 1990; Parks and Muskavitch, 1993; Rhyu et al., 1994; Schweisguth et al., 1996). This model was consistent with the attractive hypothesis that the N pathway was successively exploited over the course of sensory organ evolution to generate non-neuronal support cells from a theoretical "neuron-only" progenitor sensory lineage.

And then there were five: the glial cell joins the lineage

In subsequent years, the molecular mechanisms of sensory cell fate determination were pursued more aggressively. As the sequence of events in the cell lineage became defined at higher resolution, a discrepancy in the accepted model emerged about the relative timing of the cell division producing the neuron and sheath cell. It was originally shown to occur after pIIa cell division (Gho et al., 1996; Wang et al., 1997; Gho and Schweisguth, 1998;

Hartenstein and Posakony, 1989). However, when using the homeodomain transcription factor Prospero (Pros) as a cell marker, the pIIa sister cell was definitively shown to divide prior to pIIa (Manning and Doe, 1999; Reddy and Rodrigues, 1999b).

Several explanations to resolve these conflicting data were put forth, including the existence of additional, previously unrecognized cell division in the sensory lineage (Manning and Doe, 1999, Reddy and Rodrigues, 1999b). This was indeed shown to be the case by the Schweisguth and Rodrigues labs (Gho et al., 1999; Reddy and Rodrigues, 1999a). Notably, the study of Gho and colleagues developed the powerful technique of live imaging of sensory development using sensory organ-specific expression of GFP and time-lapse confocal microscopy. This strategy allowed divisions within the SOP lineage to be followed real-time, and clearly showed that four, and not three, divisions occur. Additional experiments using fixed material clearly substantiated this view and led to a new lineage for microchaetes. In particular, the pIIa sister cell named pIIb does divide prior to pIIa, but one of pIIb's daughters (now referred to as pIIIb) subsequently undergoes an additional cell division to then generate the sheath cell and neuron (Fig. 2D). It is worth reiterating the point that with the change in nomenclature, the cell producing the neuron and sheath cell, referred to as pIIb in reports prior to mid-1999 (Gho et al., 1996; Wang et al., 1997; Gho and Schweisguth, 1998), no longer corresponds to what is now called pIIb; it is instead the cell currently known as pIIIb.

The revised lineage nicely resolved issues regarding the division order and the mysterious origin of the frequently observed "fifth" cell. These studies further established the identity of the fifth cell as a small glial cell by demonstrating that it not only is the strongly Pros-reactive daughter of pIIb, but subsequently expresses glial-specific markers such as Glial cells missing (Gcm) and Repo (Gho et al., 1999; Reddy and Rodrigues, 1999a). All other glial cells (with the exception of the midline glia) are similarly derived from neural lineages (Jones, 2001), thus making the origin of this mysterious cell analogous to most other types of glia. Many classical studies, including some focusing on cockroach and cricket sensilla, similarly described a fifth, possibly glial, basal cell that is associated with the neuron and sheath cell (Gnatzy, 1976; Gnatzy and Schmidt, 1971; Keil, 1997). This cell is likely to correspond to the fifth glial cell of *Drosophila* microchaetes. Interestingly, live imaging indicated that the glial cell of *Drosophila* microchaetes migrates subepidermally away from the remaining four cells of the lineage (Gho et al., 1999), which remain closely apposed. The previous lack of molecular markers specific for this small cell, combined with its migration, thus seemed to adequately explain how its existence had been previously overlooked.

Back to four: apoptosis of the glial cell

Interestingly, although the migratory nature of the glial cell seemed sufficient to explain its absence in the mature mechanosensory organ, it was noted that it might in principle undergo apoptosis (Reddy and Rodrigues, 1999a). This was actually shown to be the case: the glial cell undergoes programmed cell death shortly after its birth (Fichelson and Gho, 2003) (Fig. 2E). This observation was facilitated by a highly localized and strongly fluorescent marker (histone 2B::YFP) that permitted higher resolution live imaging of nuclear events, including fragmentation of the glial cell nucleus. Genetic experiments provided

evidence that the glial cell dies by programmed cell death, since glial nuclear fragmentation is suppressed in *H99* mutant clones, in which the pro-apoptotic genes *grim*, *reaper* (*rpr*) and *head involution defective* (*hid*) are absent, or in cells expressing the viral caspase inhibitor p35. Finally, glial cell fragments were shown to be phagocytosed by macrophages. As these cells are mobile, it was proposed that the previous report in which the glial cell was found to be migratory involved analyses of unusually large glial cell nuclear fragments that were engulfed by macrophages, which subsequently travelled some distance.

Does the glial cell have a function with regard to microchaete development, or does its death symbolize that it is an evolutionary relic or vestige? Glial cells in other developmental settings are well known to have functions in axonal pathfinding and neuronal survival. However, in the microchaete lineage, the glial cell dies before growth cones begin to be extended, and in some cases fragmentation is observed even before division of pIIIb (Fichelson and Gho, 2003). This suggests that the glial cells are not likely to strongly influence the normal development of the microchaete neuron. When apoptosis is blocked, glial cells are indeed associated with axons for some time and axonogenesis occurs slightly prematurely, perhaps indicative of an ancestral function for glia in this lineage. Nevertheless, this situation has no major developmental or behavioral consequences, so the rationale for glial apoptosis is mysterious at present.

Although each successive version of the microchaete lineage had in its time come to be generally accepted as correct, there is reason to believe that current analyses have been sufficiently detailed to now truly reflect "the truth". This hope is bolstered by comparisons with other peripheral sensory lineages, which collectively reveal an ancestral lineage that underlies the development of a dizzying array of insect sensilla.

Variations on a theme – principles underlying diversification of related sensory organ lineages

The thoracic microchaetes are but one of many types of peripheral sense organ present in embryonic, larval or adult *D. melanogaster*. These include other mechanosensory organs, olfactory and gustatory organs, all of which are external sensory organs, and chordotonal (proprioceptive and auditory) organs, which are internal sensory organs. Within each class, sensory organs show a great morphological diversity. For example, mechanosensory organs can appear as long bristles (macrochaetes), small bristles (microchaetes), bristles of intermediate sizes, thorn bristles, slender bristles, domes (campaniform sensilla), bifurcated hairs, and so forth. Each multicellular sensory organ is innervated by one or more neurons that bear a ciliated sensory dendrite; these have been collectively termed type I neurons (Zawarzin, 1912). In addition, there exist multidendritic (md) neurons devoid of accessory cells that are present internally in the embryo, larva and adult (Bodmer et Jan, 1987, Jan and Jan, 1993). These neurons are unciliated and classified as type II neurons; their sensory modalities are largely unknown.

Until 1999, it was thought that these various organs, all containing different numbers and types of cells, were produced from distinct classes of cell lineages. However, recent studies suggest a common developmental lineage program underlying the formation of these diverse sensory organs. This canonical lineage consists of a division of a sensory organ precursor (pI) to give two cells, one of which is the precursor (pIIa) for two outer cells, the other of which (pIIb) produces three inner cells, following its division and subsequent division of one of its daughters (pIIIb) (Fig. 3A). We now discuss the evidence for this canonical peripheral sensory lineage and how diversification has occurred via a limited set of modifications to this core lineage, including switches in developmental program subtype, changes in terminal cell fate, lineage proliferation, lineage apoptosis and cell recruitment.

Changing sense organ types: the gap between internal and external sensory organs is cut

Generating distinct sensory organs from a same canonical sensory lineage requires the activation of distinct batteries of gene expression appropriate for sensory organ subtype. The easiest way to accommodate this is through the selective expression of different transcription factors in different lineages. The overall choice between external and internal sensory organ accurately illustrates this principle.

Chordotonal organs are internalised stretch-sensitive sense organs linked to the cuticle. These organs are often made up of a complex cluster of closely associated sensory structures individually known as scolopodia (Moulins, 1976), and each scolopodium derives from an independent pI cell (Bodmer, 1989; Brewster, 1995; Okabe and Okano, 1997). At least some scolopodia are composed of five cells, including a scolopale cell that enwraps the neuronal dendrite, and three cells that link either extremity of the sensory organ to the cuticle, an attachment cell and cap cell on one end and a ligament cell on the other (Hartenstein, 88; Ghysen and O'Kane, 1989; Matthews et al., 1990; Brewster et al., 1995). Although more than one model has been proposed for the scolopidial lineage (Bodmer, 1989; Brewster, 1995), one of them has retrospectively been noticed to be highly analogous to the revised microchaete and md-es lineages (Orgogozo et al., 2001; Bellaïche et Schweisguth, 2001; Fichelson and Gho, 2003; Fig. 3), suggesting a one-to-one correspondence between the cells in these morphologically dissimilar organs.

According to this view, the cap and attachment cells correspond to the socket and shaft cells whereas the scolopale cell corresponds to the sheath cell. Our examination of the literature produces strong molecular support for this hypothesis. First, the cap and attachment cells express the socket and shaft enhancer-trap marker A1-2-29 (Blochlinger et al., 1991; Hartenstein and Jan, 1992), while the scolopale cell expresses the sheath cell marker Prospero (Doe et al, 1991; Vaessin et al., 1991). Furthermore, the ligament cell, which corresponds to the glial cell, accumulates the glial markers Gcm, Repo and Wrapper (Xiong, 1994; Campbell, 1994; Jones, 1995, Halter, 1995; Noordermeer, 1998). Eventually, the aligned arrangement of the scolopidium cells is comparable to the arrangement of the different cells of certain stretched external sensory organs.

The lineal relation between chordotonal and external sensory organs is further reinforced by genetic studies of Cut. Cut is a homeodomain-containing protein that accumulates in all external sensory cells and their precursor cells but not in internal sensory cells (Blochlinger, 1990). Loss of *cut* activity transforms external sensory organs into











Figure 3. Proposed relationships between diverse PNS lineages and an ancestral canonical lineage. As in Figure 2, cells that activate the N pathway are colored blue, those that do not (typically through inheritance of Numb) are colored red. Cells derived from divisions whose control by the N pathway is not yet established are colored grey. The canonical PNS lineage (A) is similar to that shown in Figure 2B. The larval multidendritic neuron-campaniform mechanosensory (md-mes) organ (B) and chordotonal organ (C) both follow the canonical lineage and differ only in their adoption of terminal cell fates. The md-mes lineage is placed closest to the ancestral lineage to reflect the fact that it follows a neuronal-basal lineage. (D) The larval multidendritic (md) neuron lineage is similar to that of
the larval md/mes organ, except that pIIa and pIIIb undergo apoptosis (X). The lineages of the adult microchaete (E) and gliogenic wing campaniform sensilla (G) also follow the canonical lineage except that the glial cell undergoes apoptosis in the former but proliferates in the latter (via a glial precursor, GP). The number and order of the GP divisions is not known in detail (question mark). (F) Proposed lineage for the taste bristles of the labellum. Multiple rounds of cell divisions produce additional neurons. A glial cell is associated with these sensory organs but its clonal relation to the sensory cluster has not yet been established (question mark). (H) Lineage of the coeloconic olfactory sensillum. An olfactory precursor cell (OPC) recruits additional cells into a three-cell presensillum cluster of a pIIa-like, pIIb-like and pIIc cell. The olfactory precursor cell is here proposed to be pIIb, but this has not been experimentally established (question mark). As well, the order of cell recruitment (double arrows) into the presensillum cluster is not yet known (question mark). The pIIa-like and pIIb-like cells execute sublineages characteristic of the canonical lineage. The number of neurons in an olfactory sensillum appears to be slightly variable, and other types of olfactory sensilla do not produce glial cells (not shown). (I) A subset of microchaetes (on the leg and proximal costa) recruit a bract cell (double arrow). The microchaete-generating portion of this lineage is presumed to be the same as for thoracic microchaetes, but this has not been directly demonstrated.

chordotonal organs (Bodmer et al., 1987; Meritt et al., 1993; Meritt, 1997), while ectopic Cut expression results in the reciprocal transformation (Blochlinger et al., 1991). Thus, Cut has an instructive role in execution of an external-type peripheral sense organ program. The switch can be further linked to the different proneural proteins that initiate development of these sensory organs: Achaete and Scute proneural proteins direct the development of external mechanoreceptors, which express Cut in pI and all of its daughters, while Atonal directs the development of all chordotonal organs at least in part by repressing Cut (Jarman and Ahmed, 1998). Thus, individual pI cells have certain multipotent properties, and the specific type of sensory organ program they execute is influenced by expression of selector genes.

Changing terminal lineage fates: Gcm redirects a presumptive neuron to the glial fate

Multidendritic neurons lacking accessory cells are found at many stages throughout *Drosophila* life. A subset of these are positioned near external sensory organs (Ghysen, 1986), and analysis of *lacZ*-expressing clones suggested that individual SOP cells indeed give rise to both md neurons and campaniform external sensory (es) organs (Brewster, 1995; Vervoort, 1997). In the larva, the dendritic arborisation of each of these multidendritic neurons covers a characteristic region of the cuticle, suggesting that they are receptive to stimuli different from the one received by campaniform organs (Grueber, 2002). Thus, these embryonic pI cells produce two functionally independent sensory organs, one campaniform organ and one multidendritic neuron.

The nature of the lineage that produces these md and es organs was controversial for some time, and the md neuron has been variously proposed to be the sibling of the es neuron (Brewster, 1995) or born of a hypothetical "p0" cell and thus sibling to pI (Vervoort, 1997). Careful observation of the successive cell divisions demonstrated that the md neuron is

actually born from pIIb and is sibling to pIIIb (Orgogozo, 2001). Therefore, the md-es lineage is identical to that of the microchaete lineage except that an md neuron is produced in place of the apoptotic glial cell of the latter. The likeness of the microchaete glial cell and md neuron is supported by the observation that both cells migrate some distance away from their initial position, whereas their sibling sensory organ cells stay closely apposed. The overall relationship between these lineages is also reflected by the common order of cell divisions: pIIb first, pIIa second, and pIIIb last.

Certain wing campaniform sensilla have similarly been observed to produce two neurons, one of which extends a typical external sensory dendrite and one that displays characteristics of a multidendritic neuron (Murray, 1984). Although it was proposed that the md-like cell is the sibling of the sensory neuron (Van De Bor, 2000), in light of recent data on the embryonic campaniform lineage, we suggest that it too is born of pIIb, and sibling to the cell that subsequently produces the external sensory neuron and sheath cell.

Since the multidendritic neuron/glial cell is the only cell in the lineage that never activates the N pathway (Gho et al, 1999; Van de Bor et al., 2000), it is in some sense the basal cell type in the sensory lineage. The fact that this cell adopts a glial fate in some lineages is therefore at odds with the popular conception that neurons represent the basal state of sensory organs. Interestingly, in *gcm* mutants, the glial cell produced by the microchaete lineage and the gliogenic campaniform lineage is transformed into an Elav-positive neuron (Van de Bor et al., 2000, Fichelson and Gho, 2003), indicating that the glial cell in both lineages retains some neural potential. Taken together, these data suggest that embryonic campaniform and non-gliogenic wing campaniform organ lineages are more representative of the canonical lineage, while the microchaete and gliogenic campaniform lineages are more derived and have selectively acquired expression of Gcm.

A remarkably similar set of principles may apply to the development of chordotonal organs. Firstly, some embryonic chordotonal organs that lack the glial-like ligament cell have been specifically shown to have lineage relation to a multidendritic neuron (Brewster, 1995). According to BrdU incorporation studies (Bodmer, 1989) and in light of the new data, we propose that both the md neuron and the chordotonal organ cells arise from a mixed chordotonal-md lineage with the same pattern of cell divisions as the mixed campaniform-md lineage. Secondly, in *gcm* mutants, the ligament cells of the embryonic lch5 chordotonal organ are transformed into neurons and each scolopidium becomes bi-innervated by two Elavpositive neurons (Jones, 1995), perhaps revealing an ancestral bi-innervated sensory organ. Indeed, the *D. melanogaster* auditory organ located on the antenna consists of an array of \sim 100 scolopidia, each of which lacks a ligament cell but instead contains two sensory neurons whose dendrites insert into the same scolopale (Hertweck, 1931; Eberl et al., 2000).

Thus, a neuron-basal state can be revealed in multiple extant lineages, whose diversification into glial/ligament cells is attributable to Gcm function.

Lineage-specific cell proliferation

Cell proliferation can add to a sensory organ's complement. Analysis of the development of some wing campaniform organs showed that their primary precursor cell

produces the four sensory organ cells and a Gcm- and Repo-positive glial cell through the exact same stereotyped pattern of cell divisions as in the microchaete lineage (Van De Bor and Giangrande, 2001). However, the glial cell does not undergo apoptosis in this case but proliferates to produces an average of six glial cells that migrate away (Fig. 3G). The molecular control of the surprisingly variable fates of glial cells — to survive, die, or proliferate — remains to be fully understood, but is clearly dependent on cellular context.

Taste organs comprise several neurons in addition to the three accessory cells (Nayak and Singh, 1983; Ray et al., 1993). For example, leg and labellar taste bristles are typically innervated by one mechanosensory and four chemosensory neurons. Accordingly, BrdU incorporation studies indicated that the lineage of the five-neuron labellar chemosensory bristles is highly similar to the canonical lineage, except that the cell that corresponds to the md neuron/glial cell undergoes additional cell divisions to produce four chemosensory neurons (Ray et al., 1993). However, this lineage model does not account for the formation of the glial cell detected next to chemosensory neurons in flies and other insects (Lawrence, 1966; Nayak and Singh, 1983; Peters, 1963), suggesting that an additional cell division may occur within this lineage.

All *Drosophila* taste organs appear to originate from Cut-positive precursor cells that specifically accumulate the transcription factor Pox-neuro (Poxn) (Dambly-Chaudiere et al., 1992). In *poxn* mutants, poly-innervated taste organs are transformed into mono-innervated sensory organs whereas ectopic expression of *poxn* leads to the opposite transformation (Awasaki and Kimura, 1997; Awasaki and Kimura, 2001; Dambly-Chaudiere et al., 1992; Nottebohm et al., 1994a). Interestingly, *poxn* activity is independent of *cut*. Expression of *poxn* in sensory precursors is maintained in *cut* mutants, with resultant transformation of external poly-innervated organs into internal, but still poly-innervated organs (Vervoort et al., 1995). Thus, *poxn* regulates the number of cell divisions within lineages. There is variability in neuronal numbers amongst taste bristles, with distinct subclasses being innervated by two, three or four neurons (Ghysen et al., 1986; Nayak and Singh, 1983). This suggests that additional factors may act in concert with Poxn to regulate neuronal proliferation appropriately in different taste bristle lineages.

Apoptosis shapes sensory organs

Many examples of cell death in developing nervous systems have been described, in *Drosophila* as well as in vertebrates. However, as opposed to the glial death prescribed by fate as seen in the microchaete lineage, most of them involve death through stochastic mechanisms. For example, during development of the vertebrate nervous system, the observed massive cell death of neurons is thought to reflect the failure of these neurons to obtain adequate amounts of specific neurotrophic factors that are produced by the target cells and that are required for the neurons to survive (reviewed in Raff, 1993). Similarly, during *Drosophila* embryogenesis, midline glial cells compete to survive for a limited amount of Spitz, an EGF receptor ligand that is secreted by neurons (Sonnenfeld and Jacobs, 1995; Zhou et al., 1997, Bergmann et al., 2002). Excess uncommitted cells may also undergo programmed cell death, such as during fly eye development (Wolff and Ready, 1991).

Examination of the literature produces a few possible examples of non-stochastic fated deaths in neural lineages. For example, the posterior wing margin is lined with non-innervated mechanoreceptors that consist only of shaft and socket cells. Although their lineage has not been studied in detail, it is reasonable to suppose that they derive from a modified bristle lineage in which pIIb undergoes programmed cell death. Similar observations have been made with non-innervated wing scales of Lepidoptera, where one of the pI daughter cells undergoes stereotyped cell death (Stossberg, 1938, Galant et al., 1998). Conversely, studies of the interommatidial bristle lineage in the *Drosophila* eye have suggested that two support cells of these modified mechanoreceptors may die, leaving behind only the neuron and possibly the sheath cell (Perry, 1968; Cagan and Ready, 1989).

The best-studied case of neural lineage death aside from the microchaete occurs during development of embryonic md-solo neurons. Unlike md neurons produced from md-es lineages, md-solo neurons are not associated with external sense organs. Although it might be reasonably supposed that md-solo neurons arise de novo, they were recently found to derive from an md-es-type lineage in which both pIIa and pIIIb cells specific activate the proapoptotic genes *reaper* and *grim* and undergo programmed cell death (Orgogozo, 2002). When apoptosis is blocked, both of these cells divide to produce socket/shaft and a neuron/sheath cell pairs, respectively, resulting in an apparently normally formed ectopic external sensory organ. Thus, to produce a single multidendritic neuron, the canonical lineage program is launched and undesired cells are removed by apoptosis.

In the case of the md-solo lineage, the Notch-inhibitory protein Numb is inherited by the surviving daughter cell of each cell division, suggesting that execution is positively regulated by N activity. Accordingly, Numb is necessary and sufficient to prevent apoptosis, while activated Notch is able to ectopically trigger death in this lineage (Orgogozo, 2002). By contrast, it is the glial cell of the microchaete lineage that dies, the only cell in this lineage that never activates the N pathway (Fichelson and Gho, 2003). When considered alongside the deaths in the lineages of non-innervated mechanoreceptors and interommatidial bristles, it is clear that there is no consistent linkage between N activation and induction of apoptosis.

Depending on cell context, Notch may either induces (md-solo lineage), inhibits (microchaete lineage) or have no influence on apoptosis (pI cell division in the microchaete lineage for example). Remarkably, in both md-solo and microchaete lineages, apoptosis is triggered by pro-apoptotic genes located in the H99 genomic region (Orgogozo, 2002; Fichelson and Gho, 2003; White, 1994; Grether, 1995; Chen, 1996). How this genomic region integrates various signals such as N signalling and leads to selective expression of pro-apoptotic genes in particular cells during development will certainly be a challenge for the future. A final point is that microchaete glial death is independent of its glial identity: in *gcm* clones, the extra neuron obtained at the expense of the glial cell fate still dies (Fichelson and Gho, 2003). This suggests that glial cell apoptosis is not a simple consequence of adoption of this fate.

Joining the club: EGFR signaling recruits sensory cells

Non-lineally related cells are recruited into some sense organs. This is the principal mechanism for assembly of the *Drosophila* eye following selection of founder R8 cells, and recruitment relies upon reiterative use of EGFR signaling (Freeman, 1996). Relatively few peripheral sense organs conscript cells, but those that do so also utilize EGFR signals as a general strategy to recruit cells into a developing sensillum.

Cell recruitment is used during the development of most poly-scolopidial chordotonal organs. In the embryo, the pentascolopidial organ lch5 arises from five pI cells, each of which executes its characteristic lineage (see above). Initially, three pI cells classically arise from an atonal-positive proneural cluster. Then, the most ventral pI cell provides a source of Spitz/EGFR signalling which is necessary for the other two pI cells to appear (zur Lage, 1997; Okabe, 1997). This highlights two mechanisms for creation of a poly-scolopidial organ: several pI cells can be simultaneously specified from a proneural cluster that later cluster together, or several pI cells may be recruited by an earlier specified pI cell. Both processes are used during lch5 development. In a similar manner, the adult femoral chordotonal organ arises from a group of some 70-80 pI cells in the leg imaginal disc during third larval instar and early pupa (zur Lage, 1999). SOPs are progressively recruited from a persistent proneural cluster and accumulate in a large SOP mass. The newly formed chordotonal SOPs are the source of Spitz signalling, which is required to promote the recruitment of new SOPs. Finally, the dorsalmost lch5 SOP does not recruit other chordotonal SOPs, but instead uses Spitz/EGFR signaling to recruit an average of six non-neural oenocytes (Rusten, 2001; Elstob, 2001). Overall, there is tremendous variability in the number of recruited elements in different settings: one (vch chordotonal SOP, zur Lage, 1997), two (lch5 chordotonal SOP, Elstob, 2001), four to nine (oenocytes; Rusten, 2001; Elstob, 2001). Experimental stimulation of EGFR signaling increases the number of cells recruited in each of these settings, indicating that the level of EGFR signaling must be carefully controlled to give the desired outcome.

Neurogenesis of chordotonal organs and R8 photoreceptors is initiated by the Ato-type proneural protein, Atonal. This has led to speculation that Ato-type proneural proteins may be disposed to activate programs of gene expression that lead to clustering or recruitment of cell types, potentially by directly activating one of more components of the EGF receptor pathway (zur Lage, 1997). However, cell recruitment is not entirely restricted to sensory organs determined by Ato-type proneural proteins. Unique mechanosensory bristles located on the legs and the proximal costa of the wing, specified by AS-C class proneural proteins, are associated with a small cuticular protrusion secreted by a single cell, the bract. Clonal analysis indicated that the bract cell is not lineally related to the cells of the bristle organ but requires a neighboring bristle organ for its specification (see introduction in Held, 2002 and references therein). Recent studies now demonstrate that the bristle cells induce a neighboring cell to adopt the bract fate through Spitz/EGFR signalling via the Ras/MAPK pathway (del Alamo, 2002; Held, 2002). As is the case for chordotonal organ induction, the number of bract cells recruited can be experimentally modulated by manipulating the level of Spitz/EGFR signalling. The sensitive period for bract induction occurs at the three- or four-cell stage of the bristle lineage (Held, 2002, Nottebohm, 1994), and genetic and pharmacological studies suggest that the socket and/or shaft cell may be responsible for bract induction (see introduction in Held, 2002 and references therein). Together, these data indicate that the bract recruiting cell does not seem to be the SOP, as opposed to chorodotonal inducing cells (zur Lage, 1997; Okabe, 1997). The physiological function of the bract is not known.

Like poly-scolopidial chordotonal organs, some external sensory organs in the *Drosophila* larval anterior region are composed of multiple neurons and support cells that seem to represent an aggregation of several sensory units. For example, the three large organs of the antenno-maxillary sensory complex comprise around ten clustered sensilla units while the Keilin organ possess five type I neurons innervating three shafts (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). In the EGFR signaling mutants *rhomboid* and *spitz*, these organs lack some neurons and cuticular parts, suggesting loss of sensory units (Mayer, 1988). Conversely, additional cuticular structures and neurons are detected in mutants in which the EGFR signalling pathway is enhanced (Mayer, 1988; Okano, 1992). These results strongly suggest that formation of poly-unit external sensory organs also involves Spitz/EGFR-mediated cell recruitment.

Common features of sensory lineages and the evolutionary origin of the canonical lineage

The collected observations indicate that most (if not all) peripheral sensory lineages in Drosophila derive from a common ancestral canonical lineage, and that pI cells are hardwired to execute this sequence of cell divisions. Only a few types of modification to this core lineage are necessary to account for peripheral sense organ diversification. Detailed analyses of the successive cell divisions in peripheral lineages reveal common molecular and cell biological properties, which are probably indicative of the core developmental program hardwiring the canonical sensory lineage. These provide clues as to how such a stereotyped pattern of cell divisions may have been constructed during evolution.

Control of cell lineage asymmetry by spindles and crescents: from a plb- to a pl-cell lineage?

As mentioned earlier, cell-cell signalling through the Delta-Notch pathway ensures that the daughter cells of every division in PNS lineages adopt distinct fates. Although both daughters are capable of sending and receiving signals through this pathway, the direction of signalling is usually made largely unidirectional by the unequal segregation of cell fate determinants into one of the daughter cells. Key determinants are localized to "crescents" on one side of the cell cortex prior to mitosis, and this is coordinated with the axis of division so that protein crescents are subsequently inherited by only one of the two daughters. In the past half-decade, a multitude of crescent-forming proteins and RNAs have been identified, along with much of the cell biological machinery that mediates their localization. One of the most studied determinants is Numb, which localizes asymmetrically during divisions of embryonic CNS neuroblasts (NBs) and in all PNS lineages examined, including the microchaete lineage, embryonic campaniform lineage and md-solo lineage (Rhyu et al., 1994; reviewed in Chia and Yang, 2002). Numb appears to be most proximate of crescent-forming proteins in controlling N activity. It directly links Notch to the endocytic pathway and may negatively regulate N by promoting its internalization (Berdnik et al., 2002).

Crescent formation by itself is insufficient to guarantee inheritance by only one daughter cell: determinant localization must also be coordinated with orientation of the mitotic spindle. Not surprisingly then, the orientation of cell divisions within sensory lineages appears carefully controlled, and successive remodeling of cell polarity occurs within sensory lineages. This has been particularly noticed for the microchaete and embryonic campaniform lineages (Gho and Schweisguth, 1998; Gho et al., 1999; Roegiers et al., 2000; Orgogozo et al., 2001). In both lineages, first, the pI cell acquires a cell polarity different from its neighbooring epithelial cells and divides within the plane of the epithelium along a particular axis. Then, the pIIb cell polarity is remodeled into an apical-basal polarity and divides perpendicular to the plane of the epithelium. Later, the pIIa and pIIIb cell divide with an orientation similar to their mother cells, pI and pIIb respectively. Similarly, in the md-solo lineage, pI cell division occurs within the plane of the epithelium whereas the pIIb division occurs roughly perpendicular to the plane of the epithelium (Orgogozo et al., 2002). Thus, these successive changes in cell polarity appear to be consistently related to the canonical lineage.

NBs resemble pIIb/pIIIb in that they also divide perpendicular to the epithelial plane. Cells that do so usually utilize the pre-existing apical-basal polarity of the epithelium to orient their axis of division and proteins involved in epithelial polarization also mediate asymmetric localization of determinants. The mechanism of this linkage has been well studied with respect to NB division and is coordinated by Inscuteable (Insc) (reviewed in Chia and Yang, 2002 and references therein). In interphase, the apically located PDZ domain protein Bazooka (Baz) and its associated proteins Par6 and atypical protein kinase C (aPKC) are joined by Insc, which recruits Partner of Inscuteable (Pins) and G α i. Together, this so-called 'apical complex" controls both apical-basal spindle re-orientation and basal localization of Miranda (Mira), Partner of Numb (Pon) and Numb. In the absence of any of the aforementioned components, spindle orientation is randomized and/or localization of determinants is lost. The essential role for Insc in apico-basal spindle orientation is revealed with experiments in which its ectopic expression is sufficient to reorient the division axis of epidermal cells to be perpendicular to the epithelial plane (Kraut et al., 1996).

All the proteins asymmetrically localized in dividing neuroblasts which have been analysed so far are found at the exact same location in dividing pIIb cells (Numb, Pon, Pros, Mir, Insc, Baz, Pins (Reddy and Rodrigues, 1999; Gho et al., 1999; Roegiers et al., 2001; Orgogozo et al., 2001; Le Borgne et al., 2002)). Furthermore, mechanistic links between pIIb and neuroblast division have been established, including a strong asymmetry between daughter cell and spindle sizes, with the basal cell always being smaller in both respects, and dependence on the Insc/apical complex machinery (microchaete lineage, Reddy and Rodriguez, 1999; Gho et al., 1999; Roegiers et al., 2001; embryonic campaniform lineage, Orgogozo et al., 2002). This suggests that the pIIb cell is highly similar to neuroblasts.

Since pI and pIIa cells divide within the epithelium plane, they must utilize other cues to orient their divisions. Accordingly, Insc does not accumulate in pI and pIIa cells

(microchaete lineage, Bellaiche et al., 2001; Le Borgne et al., 2002; embryonic campaniform lineage, Orgogozo, 2001, md-solo lineage, Orgogozo, 2002). Moreover, components of the apical complex are separated in microchaete pI cells: Baz/aPKC (and presumably Par-6) are found posteriorly while Pins/Gai are found anteriorly (Bellaïche et al., 2001; Schaeffer et al., 2001; Schober et al., 2001). Instead, the antero-posterior orientation of the division is controlled by components of the planar polarity pathway, most notably by Frizzled (Fz), a seven-transmembrane receptor of the Wnt family (Gho and Schweisguth, 1998). In *fz* mutants, Pins/Gai/Numb and Baz continue to form cortical crescents that localize to opposite poles but they no longer align along the antero-posterior axis (Roegiers et al., 2001; Bellaiche et al., 2001b).

These observations reveal two types of divisions within the lineage: neuroblast-like divisions (pIIb and pIIIb) and divisions within the plane of the epithelium (pI and pIIa). This finding raises the interesting possibility that the portion of peripheral sense organ lineages that generates internal cells (pIIb branch) may be ancestrally related to a neuroblast-like lineage (Gho et al., 1999; Roegiers et al., 2000), while the ability to generate asymmetric cell divisions within the epithelial plane was a subsequent innovation and addition to the peripheral sensory lineage. According to this idea, how a planar pI cell division may have been added to the neuroblast-like pIIb lineage during evolution has remained relatively obscure until a recent study of olfactory sensilla development.

Joining the club again: from cell recruitment to asymmetric cell division?

Clonal analysis demonstrated that cells of individual olfactory sensilla are of mixed lineage (Reddy et al., 1997). Consistently, observation of olfactory sensilla development indicates that one olfactory precursor cell subsequently becomes associated with several cells that together comprise a presensillum cluster (PSC) in the absence of cell divisions (Ray and Rodrigues, 1995). Then, cells of the PSC divide to give rise to differentiated cells of an olfactory sensillum (Ray and Rodrigues, 1995; Reddy et al., 1997).

Recent detailed analysis of presensillum cluster cell lineages in gliogenic olfactory sensilla (Fig. 3L) have led to the rather unexpected conclusion that the olfactory precursor cells of a presensillum cluster are pIIa- and pIIb-like cells that execute lineages that are identical to those in the canonical PNS lineage (Fig. 3H) (Sen et al., 2003). Although not lineally related, the pIIa- and pIIb-like cells present strinking molecular and developmental similarities with their apparent counterparts in the canonical lineage. For example, Prospero regulates lineage identity and accumulates in pIIb-like cells and not in pIIa-like cells, as seen for microchaete and embryonic campaniform lineages. As in the canonical lineage, pIIb undergoes two divisions to produce a migratory glial cell, a neuron and a sheath cell, while pIIa undergoes a single division to generate a socket and shaft cell (Fig. 3A, H) (Sen et al., 2003). A third cell was also detected in the presensillum cluster, pIIc, which was proposed to divide to generate two additional neurons of the olfactory sensilla. Its possible counterpart in the canonical lineage remains unclear.

This newly described lineage suggests an evolutionary model in which a neuroblastrelated, pIIb-type cell lineage was present before the canonical sensory lineage. This hypothetical pIIb-derived sensillum may have recruited additional (planarly dividing, pIIalike) support cells from the neighboring epithelium, an ancestral situation that may be preserved in existing olfactory lineages. It is tempting to imagine that this involved Spitz/EGFR signaling, given its general usage in sensory organ cell recruitment, although it remains to be determined if presensillum cluster recruitment is in fact mediated by EGFR signaling. We propose that recruitment of a pIIa-like cell by a pIIb-like cell may have subsequently been transformed into an asymmetric cell division that produces pIIa and pIIb cells related by lineage. Satisfactory markers do not yet exist to assess whether the first olfactory precursor cell that appears is a pIIa- or a pIIb-type cell. However, if its properties are indeed more ancestral, we would predict it to be a pIIb-like cell..

Numb as a way to reinforce lineage asymetry?

When Notch signaling is reduced, inner sensory cells develop at the expense of the outer cells in all sensory organs examined (microchaetes, Hartenstein and Posakony, 1990; wing campaniform organs, Van de Bor and Giangrande, 2001; embryonic external sensory organs, Hartenstein and Campos-Ortega, 1986; Vervoort et al., 1997), indicating a pIIa-to-pIIb-like transformation. Indeed, Notch signaling is activated and required in the pIIa cell, whereas it is inhibited in its sibling pIIb cell following Numb asymmetric segregation into the pIIb cell (microchaete lineage, Gho et al., 1999, embryonic campaniform lineage, Orgogozo et al., 2001; md-solo lineage, Orgogozo et al., 2002).

Interestingly, in the olfactory presensillum cluster, the binary choice between pIIa and pIIb cell fates is also regulated by Notch. As for the other sensory organs, inner olfactory cells develop at the expense of the outer cells when Notch signaling is reduced (Sen, 2003). Since these cells are not clonally related, this appears to be the only case so far of a N-regulated lineage cell fate choice that is not also regulated by asymmetric inheritance of Numb during mitosis. Again, if the olfactory lineage is taken to have more ancestral characteristics than the canonical lineage, then it implies that usage of Numb to control the binary cell fate decision pIIa/pIIb might have appeared after a symmetry-breaking mechanism mediated by Notch solely. For example, hypothetical simple lineages would be composed of one cell division producing two similar cells, and Notch would be used in a random (bidirectional signaling) process to make signaling biased and ensure the two sibling cells acquire distinct cell fates. Later, Numb may have been used to make signaling biased and increase fidelity, which might have been very important in sensory lineages where each cell must absolutely take the correct fate. This scenario would also explain why *Notch* has such a general role in developmental cell fate choices whereas *numb* has very specific roles, mostly in cell lineages.

Remarquably, in most cell fate decisions examined in Mammals and flies that involve Notch, Notch has been noticed to determine the most non-neuronal cell fates. This curious coincidence also applies to the canonical lineage where Notch promotes the pIIa, pIIb and sheath cell fates, versus the pIIb, md neuron and sensory neuron fates, respectively. This suggests that an ancestral function of Notch might have been to favor accessory cells from sensory cells. Remarkably, the *Drosophila* embryonic dbd lineage is a possible extant example of an early step in the building of the canonical lineage during evolution. It consists of a single N-regulated division of a precursor cell to generate the multidendritic neuron dbd and an associated glial cell. And accordingly, N is activated in the glial cell and Numb is inherited by the neuron (Bodmer, 1989; Brewster and Bodmer, 1995; Umesono,2002).

Building the canonical lineage

All together, our analysis leads us to propose that the canonical sensory lineage has been constructed during evolution through successive additions of a relatively few developmental processes. These are: Notch signaling to generate asymmetry in cell fates, asymmetric segregation of Numb during mitosis, variation in number of cell divisions, recruitment of cells via EGFR signalling, neuroblast-like asymmetric cell division with Numb segregating into the basal cell, and planar asymmetric cell division.

Importantly, these different developmental processes were not necessarily involving sensory development. Indeed, formation of many other *Drosophila* tissues involves stereotyped cell lineages, asymmetric segregation of Numb and proneural genes during their development, including the CNS, the muscle cells, the tip cell at the distal end of Malpighian tubules, and probably also the cardiac cells. It is thus conceivable that the canonical sensory lineage was constructed by developmental mechanisms previously used in non-sensory tissues.

Unfortunately, the available data on Metazoa development do not allow us to apprehend in which order these different processes were assembled during evolution. Furthermore, nature is very likely to have taken complicated routes to construct the canonical sensory lineage. Evidently, the canonical lineage appears to be very successful and gives rise to the great majority of peripheral sensory lineages in the present-day fly. We speculate that its incorporation of multiple layers of regulation that ensure maximal cell-type diversity and consolidation of the entire lineage into a single pI cell made it more "reliable" and stable as a platform for further evolutionary tinkering to generate sensory organ diversity compared to a strategy in which portions of the lineage must be recruited.

At least, available data on species other than *Drosophila melanogaster* allow us to grossly estimate when the canonical lineage appeared during evolution. But prior, it is worth noticing that if a sensory organ morphologically similar to a *Drosophila* one is found in another species, this does not mean that it also originates from the canonical lineage. Indeed, the developmental pathways underlying the formation of a particular organ may have changed during evolution without modifying the resulting organ. Formation of the nematode vulva is such a good example (reviewed in Gibson, 2001). Two developmental studies clearly indicate the presence of the canonical lineage in other insect species. Firstly, in the moth *Manduca sexta*, BrdU incorporation studies indicate that an md neurone is associated by lineage with the four-cell larval bristle and originates from a pIIb-like cell that executes a lineage identical to the one in the canonical lineage (Grueber, 1999). Secondly, the lineage described in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* some 37 years ago corresponds exactly to the canonical lineage. SOPs of mechanosensory organs in this insect were observed to divide within the

plane of the epithelium. Then, one daughter cell divides perpendicularly to the plane of the epithelium (pIIb) before its sister cell divides within the plane of the epithelium and generates two outer cells (pIIa). Two outer and three inner cells are produced, with one of the inner cells undergoing nuclear breakdown (a possible sign of apoptosis), thus leaving four surviving cells in the mature organ (Lawrence, 1966). This bug microchaete lineage is incredibly similar to the *Drosophila* microchaete lineage. This suggests that in addition to the canonical lineage, maybe even the microchaete lineage was present in their common ancestor.

Analyses of neural lineages in other species have been most rigorously performed in *C. elegans*, for which the lineage of the entire organism has been described (Sulston and Horvitz, 1977). Of the ten different types of sensilla, five are composed of cells that originate from different lineage branches and subsequently cluster together. Of the remaining five that contain at least some cells related by lineage, four can be plausibly related to the canonical *Drosophila* lineage, with the male post-cloacal sensory lineage being most similar. As in *Drosophila*, the *atonal* ortholog is required to specify neuronal and sensory cell fates in *C. elegans* (Zhao, 1995; Portman, 2000). The operation of the core Notch pathway has also been conserved in *C. elegans* (Ruvkun and Hobert, 1998), but it has not been characterized with respect to these particular neural lineages. In addition, although Numb and Prospero orthologs are present in nematodes, neither has been studied genetically (Ruvkun and Hobert, 1998). Thus, while the general similarity between these nematode lineages and the canonical insect lineage is tantalizing, their lineal relationship cannot be adequately assessed at present.

A similarly incomplete situation applies to vertebrates. Conservation of the genetic machinery is compelling: proneural bHLH-encoding genes, the Notch pathway and Numb are utilized in a functionally conserved fashion to initiate neurogenesis and regulate asymmetric neural cell divisions (reviewed in Bertrand, 2002 and in Cayouette, 2002). Unfortunately, events within sensory lineages are not easily amenable to in vivo temporal analysis with single-cell resolution as in flies and worms (Qian et al., 1998). Nonetheless, vertebrate CNS development may use defined sublineages (Qian et al., 1998) and striking parallels are observed between the genetic developmental pathways and physiology of the mammalian inner ear and *Drosophila* sensory organs. This suggest that the mammalian inner ear may be potentially evolutionarily related to *Drosophila* sensory organs and share common aspects of lineage (Adam et al., 1998; Eddisson et al., 2002).

In conclusion, this comparative developmental analysis strongly suggests that the canonical lineage predates the separation of Holometabola (fly) from Hemipteroid (milkweed bug) (which is estimated to be 250-350 million years old). Whether the canonical lineage is much older remains to be investigated.

Concluding remarks

The history of our understanding of the mechanosensory lineage and other *Drosophila* sensory lineages embodies two optimistic philosophical perspectives of scientific pursuit. The first is that novelty continues to arise even in extremely well-studied model systems. This underscores the hopeful proposition that things in nature are almost always more complicated than we expect, and suggests that in spite of what we know, there is still much left to

discover. In fact, despite all that has been learned thus far, the book is not yet closed with regard to understanding sensory lineages. For example, the molecular mechanisms regulating the temporal sequence of the developmental events hard-wired by SOPs are totally unknown. Sequential generation of different cell types through successive mitosis during development seems to be a widespread developmental mechanism in Metazoa (Salazar-Ciudad et al.,2003) and very little is known about this process. The wide variety of *Drosophila* sensory lineages described here provides ideal settings in which to investigate this matter.

A second precept is that despite life's complications, careful studies can reveal connections between disparate systems. The relationships between diverse peripheral sense organ lineages, which seem so clear and obvious in retrospect, depended upon multiple revisions and re-interpretations of existing data. Nevertheless, the connections were made following years of meticulous analyses. This gives hope that we may be able to eventually understand something as amorphous and overwhelming as the question of how life is assembled.

Acknowledgments

Many colleagues engaged in enlightening discussions, shared unpublished observations, and provided useful critiques of this review, including Michel Gho, Angela Giangrande, Volker Hartenstein, Veronica Rodrigues, François Schweisguth, Chris Doe, Laurina Manning, Fabrice Roegiers, Thomas Keil, Kristin White and Adina Bailey. Their input was invaluable and gratefully acknowledged. E. L. also recognizes the gracious support of Gerald Rubin and the Damon Runyon Cancer Research Foundation, DRG 1632. V. O.'s work was supported by grants to François Schweisguth from the Centre National de la Recherche Scientifique and Assocciation pour la Recherche sur le Cancer (ARC4512).

References

Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J. (1998). Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with Drosophila sense-organ development. *Development* **125**, 4645-54.

Awasaki, T. and Kimura, K. (1997). *pox-neuro* is required for development of chemosensory bristles in *Drosophila*. J. Neurobiol. **32**, 707-721.

Awasaki, T. and Kimura, K. (2001). Multiple function of poxn gene in larval PNS development and in adult appendage formation of Drosophila. *Dev Genes Evol* 211, 20-9.

Bate, M. (1978). Development of sensory systems in Arthropods. In *Handbook of sensory physiology* (ed. M. Jakobson), pp. 1-53. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Baylies, M. K., Bate, M. and Ruiz Gomez, M. (1998). Myogenesis: a view from Drosophila. *Cell* **93**, 921-7.

Bellaïche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J. A., Brand, A. H. and Schweisguth, F. (2001a). Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology* **3**, 50-7.

Bellaïche, Y., Radovic, A., Woods, D. F., Hough, C. D., Parmentier, M. L., O'Kane, C. J., Bryant, P. J. and Schweisguth, F. (2001b). The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in Drosophila. *Cell* 106, 355-66.

Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M. and Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila. *Dev Cell* **3**, 221-31.

Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z. and Steller, H. (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell* **2**, 159-70.

Berlese, A. (1909). Sistema periferico sensoriale. *Gli Insetti* 1, 601-699.

Bertrand, N., Castro, D. and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neuro.* **3**, 517-530.

Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of Cut, a protein required for external sensory organ development, in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes and Dev.* **4**, 1322-1331.

Blochlinger, K., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1991). Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of Cut in *Drosophila*. *Genes and Dev.* **5**, 1124-1135.

Bodmer, R., Barbel, S., Sheperd, S., Jack, J. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1987). Transformation of sensory organs by mutations of the *cut* locus of *D. melanogaster*. *Cell* **51**, 293-307.

Bodmer, R., Carretto, R. and Jan, Y. N. (1989). Neurogenesis of the peripheral nervous system in Drosophila embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* **3**, 21-32.

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

Boulianne, G. L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1991). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* **10**, 2975-2983.

Brewster, R. and Bodmer, R. (1995). Origin and specification of type II sensory neurons in *Drosophila. Development* **121**, 2923-2936.

Bullock, T. H. and Horridge, G. A. (1965). Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates. San Francisco: Freeman & Co.

Cagan, R. L. and Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Devel. Biol.* 136, 346-362.

Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C. Q. and Tomlinson, A. (1994). RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in Drosophila. *Development* **120**, 2957-66.

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

Cayouette, M. and Raff, M. (2002). Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from Drosophila to mammals. *Nat Neurosci* **5**, 1265-9.

Chia, W. and Yang, X. (2002). Asymmetric division of Drosophila neural progenitors. *Curr Opin Genet Dev* 12, 459-64.

Dambly-Chaudiere, C., Jamet, E., Burri, M., Bopp, D., Basler, K., Hafen, E., Dumont, N., Spielmann, P., Ghysen, A. and Noll, M. (1992). The paired box gene pox neuro: a determinant of poly-innervated sense organs in Drosophila. *Cell* **69**, 159-72.

del Alamo, D., Terriente, J. and Diaz-Benjumea, F. J. (2002). Spitz/EGFr signalling via the Ras/MAPK pathway mediates the induction of bract cells in Drosophila legs. *Development* **129**, 1975-82.

Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. and Scott, M. P. (1991). The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* **65**, 451-464.

Eberl, D. F., Hardy, R. W. and Kernan, M. J. (2000). Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in Drosophila. *J Neurosci* 20, 5981-8.

Eddison, M., Le Roux, I. and Lewis, J. (2000). Notch signaling in the development of the inner ear: lessons from Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11692-9.

Elstob, P. R., Brodu, V. and Gould, A. P. (2001). spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the Drosophila EGF receptor. *Development* **128**, 723-32.

Fichelson, P. and Gho, M. (2003). The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of Drosophila. *Development* 130, 123-33.

Franzl, W. (1941). Die Cytogenese der bipolaren Sinneszellen bei der Larve von Dytiscus sp. *Z Zellforsch* **31**, 54-59.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the Drosophila eye. *Cell* **87**, 651-660.

Galant, R., Skeath, J. B., Paddock, S., Lewis, D. L. and Carroll, S. B. (1998). Expression pattern of a butterfly achaete-scute homolog reveals the homology of butterfly wing scales and insect sensory bristles. *Curr Biol* **8**, 807-13.

Gho, M., Bellaïche, Y. and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573-3584.

Gho, M. and Schweisguth, F. (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **393**, 178-181.

Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., Aceves, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1986). Sensory neurons and peripheral pathways in *Drosophila* embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 281-289.

Ghysen, A. and O'Kane, C. (1989). Neural enhancer-like elements as specific cell markers in *Drosophila*. *Development* **105**, 35-52.

Gibson, G. (2001). Developmental evolution: the unbearable likeness of beings. *Curr Biol* **11**, R345-8.

Gnatzy, W. (1976). The ultrastructure of the thread-hairs on the cerci of the cockroach *Periplaneta americana* L.: The intermoult phase. *J. Ultrastruct. Res.* **54**, 124-134.

Gnatzy, W. and Schmidt, K. (1971). Die Feinstruktur der Sinneshaare auf den Cerci von *Gryllus bimaculatus* Deg. (Saltatoria, Gryllidae). I. Faden- und Keulenhaare. *Z. Zellforsch.* 122, 190-209.

Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12, 1751-1762.

Grueber, W. B., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2002). Tiling of the Drosophila epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* **129**, 2867-78.

Grueber, W. B. and Truman, J. W. (1999). Development and organization of a nitric-oxidesensitive peripheral neural plexus in larvae of the moth, Manduca sexta. *J Comp Neurol* **404**, 127-41.

Haffer, O. (1921). Bau und Funktion der Sternwarzen von *Saturnia pyri*. Schiff., und die Haarentwicklung der Saturniden-Raupen. *Arch Naturgesch*, 110-166.

Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. and Technau, G. M. (1995). The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of Drosophila melanogaster. *Development* **121**, 317-32.

Hartenstein, V. (1988). Development of *Drosophila* larval sensory organs : spatiotemporal pattern of sensory neurones, peripheral axonal pathways and sensilla differentiation. *Development* **102**, 869-886.

Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J. A. (1986). The peripheral nervous system of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 210-221.

Hartenstein, V. and Jan, Y. N. (1992). Studying *Drosophila* embryogenesis with P-*lacZ* enhancer trap lines. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 194-220.

Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389-405.

Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1990). A dual function of the *Notch* gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev. Biol.* 142, 13-30.

Held, L. I., Jr. (2002). Bristles induce bracts via the EGFR pathway on Drosophila legs. *Mech Dev* 117, 225-34.

Hertweck, H. (1931). Anatomie und Variabilität des nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Z wiss Zool* **139**, 559-663.

Hoch, M., Broadie, K., Jackle, H. and Skaer, H. (1994). Sequential fates in a single cell are established by the neurogenic cascade in the Malpighian tubules of Drosophila. *Development* **120**, 3439-50.

Huang, F., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **111**, 1087-1095.

Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1993). The peripheral nervous system. In *The Development of Drosophila melanogaster, vol. I*, (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1207-1244: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Jarman, A. P. and Ahmed, I. (1998). The specificity of proneural genes in determining *Drosophila* sense organ identity. *Mech. Dev.* 76, 117-125.

Jones, B. W. (2001). Glial cell development in the Drosophila embryo. *Bioessays* 23, 877-87.

Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82, 1013-23.

Keil, T. (1978). Die Makrochaeten auf dem Thorax von Calliphora vicina Robineau-Desvoidy (Calliphoridae, Diptera). Feinstruktur und Morphogenese eines epidermalen Insekten-Mechanoreceptors. *Zoomorphologie* **90**, 151-180.

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

Lawrence, P. A. (1966). Development and determination of hairs and bristles in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. J. Cell Sci. 1, 475-498.

Le Borgne, R., Bellaiche, Y. and Schweisguth, F. (2002). Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* **12**, 95-104.

Lees, A. D. and Waddington, C. H. (1942). The development of the bristles in normal and some mutant types of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Soc. Ser. B* 131, 87-110.

Manning, L. and Doe, C. Q. (1999). Prospero distinguishes sibling cell fate without asymmetric localization in the *Drosophila* adult external sense organ lineage. *Development* 126, 2063-2071.

Matthews, K. A., Miller, D. F. and Kaufman, T. C. (1990). Functional implications of the unusual spatial distribution of a minor alpha-tubulin isotype in Drosophila: a common thread among chordotonal ligaments, developing muscle, and testis cyst cells. *Dev Biol* **137**, 171-83.

Mayer, U. and Nusslein, V. C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the Drosophila embryo. *Genes Dev* **2**, 1496-511.

Merritt, D. J. (1997). Transformation of external sensilla to chordotonal sensilla in the cut mutant of Drosophila assessed by single-cell marking in the embryo and larva. *Microscopy Research and Technique* **39**, 492-505.

Merritt, D. J., Hawken, A. and Whitington, P. M. (1993). The role of the cut gene in the specification of central projections by sensory axons in Drosophila. *Neuron* **10**, 741-52.

Moulins, M. (1976). Ultrastructure of chordotonal organs. In *Structure and Function of Proprioceptors in the Invertebrates*, (ed. P. Mill), pp. 387-426. London: Chapman & Hall.

Murray, M. A., Schubiger, M. and Palka, J. (1984). Neuron differentiation and axon growth in the developing wing of *Drosophila melanogaster*. *Devel. Biol.* **104**, 259-273.

Nayak, S. and Singh, S. (1983). Sensilla on the tarsal segments and mouthparts of adult *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 12, 273-291.

Noordermeer, J. N., Kopczynski, C. C., Fetter, R. D., Bland, K. S., Chen, W. Y. and Goodman, C. S. (1998). Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in Drosophila. *Neuron* 21, 991-1001.

Nottebohm, E., Ramaekers, A., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1994a). The leg of Drosophila as a model system for the analysis of neuronal diversity. *J Physiol Paris* **88**, 141-51.

Nottebohm, E., Usui, A., Therianos, S., Kimura, K., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1994b). The gene poxn controls different steps of the formation of chemosensory organs in Drosophila. *Neuron* **12**, 25-34.

Okabe, M. and Okano, H. (1997). Two-step induction of chordotonal organ precursors in Drosophila embryogenesis. *Development* **124**, 1045-53.

Okano, H., Hayashi, S., Tanimura, T., Sawamoto, K., Yoshikawa, S., Watanabe, J., Iwasaki, M., Hirose, S., Mikoshiba, K. and Montell, C. (1992). Regulation of Drosophila neural development by a putative secreted protein. *Differentiation* **52**, 1-11.

Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaiche, Y. (2002). Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at mitosis. *Development* **129**, 4677-84.

Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaïche, Y. (2001). Lineage, cell polarity and inscuteable function in the peripheral nervous system of the Drosophila embryo. *Development* **128**, 631-43.

Parks, A. L. and Muskavitch, M. A. (1993). *Delta* function is required for bristle organ determination and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **157**, 484-496.

Perry, M. M. (1968). Further studies on the development of the of Drosophila melanogaster. II. The interommatidial bristles. *J Morphol* **124**, 249-62.

Peters, W. (1963). Die Sinnesorgane an des Labellen von *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera). **55**, 259-320.

Portman, D. S. and Emmons, S. W. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factors LIN-32 and HLH-2 function together in multiple steps of a C. elegans neuronal sublineage. *Development* **127**, 5415-26.

Posakony, J. W. (1994). Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in Drosophila bristle development. *Cell* **76**, 415-418.

Qian, X., Goderie, S. K., Shen, Q., Stern, J. H. and Temple, S. (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development* 125, 3143-52.

Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* **262**, 695-700.

Ray, K., Hartenstein, V. and Rodrigues, V. (1993). Development of the taste bristles on the labellum of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **155**, 26-37.

Ray, K. and Rodrigues, V. (1995). Cellular events during development of the olfactory sense organs in Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **167**, 426-38.

Reddy, G. V., Gupta, B., Ray, K. and Rodrigues, V. (1997). Development of the Drosophila olfactory sense organs utilizes cell-cell interactions as well as lineage. *Development* 124, 703-12.

Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (1999a). A glial cell arises from an additional division within the mechanosensory lineage during development of the microchaete on the *Drosophila* notum. *Development* **126**, 4617-4622.

Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (1999b). Sibling cell fate in the Drosophila adult external sense organ lineage is specified by prospero function, which is regulated by Numb and Notch. *Development* **126**, 2083-92.

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

Ribbert, D. (1967). [The polytene chromosomes of bristle-forming-cells of Calliphora erythrocephala with special consideration of sex-linked structural heterozygosity and puff patterns during metamorphosis]. *Chromosoma* **21**, 296-344.

Robertson, C. W. (1936). The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *J Morph* **59**, 351-391.

Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001). Two types of asymmetric divisions in the Drosophila sensory organ precursor cell lineage. *Nature Cell Biology* **3**, 58-67.

Rusten, T. E., Cantera, R., Urban, J., Technau, G., Kafatos, F. C. and Barrio, R. (2001). Spalt modifies EGFR-mediated induction of chordotonal precursors in the embryonic PNS of Drosophila promoting the development of oenocytes. *Development* **128**, 711-22.

Ruvkun, G. and Hobert, O. (1998). The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans. Science* 282, 2033-2041.

Salazar-Ciudad, I., Jernvall, J. and Newman, S. A. (2003). Mechanisms of pattern formation in development and evolution. *Development* 130, 2027-37.

Schweisguth, F., Gho, M. and Lecourtois, M. (1996). Control of cell fate choices by lateral signaling in the adult peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.* **18**, 28-39.

Sen, A., Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (2003). Combinatorial expression of Prospero, Seven-up and Elav identifies progenitor cell types during sense-organ differentiation in the *Drosophila* antenna. *Dev Biol* 253.

Sonnenfeld, M. J. and Jacobs, J. R. (1995). Apoptosis of the midline glia during Drosophila embryogenesis: a correlation with axon contact. *Development* **121**, 569-78.

Stern, C. (1938). The innervation of setae in Drosophila. Genetics 23, 172-173.

Stossberg, M. (1938). Die Zellvorgänge bei der Entwicklung der Flügelschuppen von *Ephestia kühniella. Z. Morph. Ökol Tiere* **34**, 173-206.

Sulston, J. E. and Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. *Dev Biol* 56, 110-156.

Umesono, Y., Hiromi, Y. and Hotta, Y. (2002). Context-dependent utilization of Notch activity in Drosophila glial determination. *Development* **129**, 2391-9.

Usui, K. and Kimura, K. (1993). Sequential emergence of the evenly spaced microchaetes on the notum of *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 151-158.

Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1991). prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in Drosophila. *Cell* **67**, 941-53.

Van De Bor, V. and Giangrande, A. (2001). Notch signaling represses the glial fate in fly PNS. *Development* **128**, 1381-90.

Van De Bor, V., Walther, R. and Giangrande, A. (2000). Some fly sensory organs are gliogenic and require glide/gcm in a precursor that divides symmetrically and produces glial cells. *Development* **127**, 3735-43.

Vervoort, M., Merritt, D. J., Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1997). Genetic basis of the formation and identity of type I and type II neurons in *Drosophila* embryos. *Development* **124**, 2819-2828.

Vervoort, M., Zink, D., Pujol, N., Victoir, K., Dumont, N., Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C. (1995). Genetic determinants of sense organ identity in Drosophila: regulatory interactions between cut and poxn. *Development* **121**, 3111-20.

Vogel, R. (1923). Zur Kenntnis des feineren Baues der Geruchsorgane der Wespen und Bienen. *Z wiss Zool* **120**, 281-324.

Wan, S., Cato, A. M. and Skaer, H. (2000). Multiple signalling pathways establish cell fate and cell number in Drosophila malpighian tubules. *Dev Biol* **217**, 153-65.

Ward, E. J. and Skeath, J. B. (2000). Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the Drosophila embryo. *Development* **127**, 4959-69.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. *Science* **264**, 677-83.

Wolff, T. and Ready, D. F. (1991). Cell death in normal and rough eye mutants of Drosophila. *Development* 113, 825-39.

Wright, K. A. (1992). Peripheral sensilla of some lower invertebrates: the Platyhelminthes and Nematoda. *Microsc Res Tech* **22**, 285-97.

Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. and Montell, C. (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system. *Genes Dev* **8**, 981-94.

Zawarzin, A. (1912). Histologische Studien über Insekten. II: Das sensible Nervensystem der *Aeschna* Larven. *Z wiss Zool* 100, 245-286.

Zhao, C. and Emmons, S. W. (1995). A transcription factor controlling development of peripheral sense organs in C. elegans. *Nature* **373**, 74-8.

Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H. and 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 US A* **94**, 5131-6.

zur Lage, P., Jan, Y. N. and Jarman, A. P. (1997). Requirement for EGF receptor signalling in neural recruitment during formation of Drosophila chordotonal sense organ clusters [see comments]. *Curr Biol* **7**, 166-75.

zur Lage, P. and Jarman, A. P. (1999). Antagonism of EGFR and Notch signaling in the reiterative recruitment of *Drosophila* adult chordotonal sense organ precursors. *Development* **126**, 3149-3157.

PARTIE 5

Évolution du patron des organes sensoriels chez les larves de Muscomorphes

Introduction

Un des apports majeurs de la biologie moléculaire du développement a été de mettre en évidence que la formation d'organes très différents est contrôlée par un petit nombre de gènes du développement conservés chez l'ensemble des Bilateria. Cette découverte pose de nombreuses questions concernant les mutations qui conduisent à un changement morphologique au cours de l'évolution. Quels sont les gènes responsables des changements morphologiques survenus au cours de l'évolution ? Font-ils partie des gènes du développement présents chez tous les Bilateria ? Si les mutations apparues au cours de l'évolution touchent ce type de gènes, comment expliquer qu'elles conduisent à des changements dans un seul tissu sans affecter les autres ?

Aujourd'hui, très peu de gènes responsables d'un changement morphologique ont été identifiés. Des études comparatives ont mis en évidence de fortes corrélations entre le patron d'expression d'un gène de développement et une différence morphologique. En particulier, les changements de domaine d'expression des gènes *Hox* corrèlent remarquablement bien avec les changements morphologiques observés le long de l'axe antéro-postérieur chez les Vertébrés et les Arthropodes (résumé dans Carroll et al., 2001). De plus, des analyses génétiques réalisées sur des espèces relativement proches ont montré que des mutations dans les gènes *Ubx*, *ovo/shaven-baby*, *scabrous*, *bric-à-brac* et *yellow* sont, au moins en partie, responsables du changement du patron des soies, des structures cuticulaires ou de la pigmentation au cours de l'évolution des drosophiles (Stern et al., 1998 ; Gurganus et al., 1999 ; Lyman et al., 1999 ; Sucena et al., 2000 ; Kopp et al., 2000 ; Wittkopp et al., 2002).

L'évolution du système nerveux périphérique de la larve de *D. melanogaster* est un modèle d'étude qui a de nombreux atouts pour identifier des gènes responsables de changements morphologiques. Premièrement, l'organisation du SNP est très bien connue (voir annexe) et très précise. Ainsi, même des changements subtils qui ont pu apparaître au cours de l'évolution peuvent être détectés. Deuxièmement, étant donné le degré de précision de l'organisation du SNP de *D. melanogaster*, il est probable que des changements vont être observés chez des espèces relativement proches. Si tel est le cas, les techniques expérimentales utilisées chez *D. melanogaster* pourront probablement être appliquées à ces espèces, rendant leur étude relativement facile. Troisièmement, les différentes étapes du développement des organes sensoriels chez *D. melanogaster* sont bien connues et de très nombreux gènes dont les mutants affectent le SNP ont été identifiés. Des gènes candidats potentiellement responsables des changements morphologiques observés peuvent donc être proposés et testés (dans un premier temps, on peut par exemple comparer leur patron d'expression chez les différentes espèces).

Après la découverte du lignage md-solo, je me suis demandé si, à certaines positions sur la larve, le lignage md-es s'était transformé en lignage md-solo ou inversement au cours de l'évolution. En particulier, je me demandais s'il existait une espèce présentant un patron d'organes sensoriels correspondant à un stade présumé ancestral par rapport à celui de *D. melanogaster*, où un organe sensoriel externe complet est présent à la position 1a (comme dans les mutants Df(1)H99 de *D. melanogaster*). Toutefois, beaucoup d'autres changements morphologiques du SNP étaient envisageables :

apparition/disparition d'un organe sensoriel à une position particulière (dû à l'apparition/disparition d'une cellule pI, à la survie/mort des cellules sensorielles...etc.)

migration de certaines cellules (dû à l'apparition de la cellule pI à un endroit différent, à une migration différente des cellules précurseurs ou des cellules de l'organe...etc.)

changement de type d'organe sensoriel (dû au changement du patron d'expression d'un gène impliqué dans la détermination de l'identité d'un organe, à un changement de l'environnement de la cellule pI, à un décalage dans le temps des étapes du développement - par exemple, les soies plus grandes proviennent de cellules pI spécifiées plus tôt que celles qui donnent des soies plus petites)

...etc.

Le patron des organes sensoriels a été décrit chez de nombreux Insectes. Dans la plupart des cas, les auteurs se sont concentrés sur la région abdominale car les organes sensoriels y sont bien visibles et leur patron est généralement reproductible d'un segment à l'autre. L'organisation du SNP des segments abdominaux du criquet Schistocerca gregaria est assez semblable à celle de D. melanogaster (Meier et al., 1991). Les neurones sensoriels forment également trois groupes (ventral, latéral et dorsal) et ils se projettent aussi dans le système nerveux central via deux nerfs (intersegmentaires et segmentaires). D'après sa position, l'organe chordotonal pleural de S. gregaria correspondrait à l'organe chordotonal lch5 de D. melanogaster. Toutefois, les autres organes sensoriels semblent difficilement comparables d'une espèce à l'autre. Dans les segments abdominaux de la chenille du papillon Manduca sexta, huit neurones multidendritiques semblent correspondrent à huit neurones multidendritiques de D. melanogaster d'après leur stade de développement et leur position au sein du segment abdominal (Grueber et Truman, 1999). Enfin, l'analyse du patron des organes sensoriels externes par microscopie électronique à balayage chez des larves de Phormia regina (Diptère) indique que la position des organes sensoriels est pratiquement la même que chez D. melanogaster mais que les organes ont des morphologies différentes (Green et Hartenstein, 1997).

Pour caractériser les changements du SNP apparus au cours de l'évolution, j'ai décidé d'analyser le patron des organes sensoriels chez les larves de plusieurs espèces de mouches. Je me suis intéressée uniquement aux segments abdominaux A1-A7. Comme ces segments présentent tous exactement le même patron d'organes sensoriels, on peut observer sept fois le même patron au sein d'un seul individu, voire 14 fois si on peut analyser à la fois les parties gauche et droite de chaque individu. Mon étude a été réalisée sur des embryons fixés à la fin de l'embryogenèse et marqués avec les anticorps anti-Cut, anti-Elav et anti-HRP. Chez *D. melanogaster*, Elav s'accumule dans tous les noyaux des neurones (Robinow et White, 1991) et Cut s'accumule dans les cellules des organes sensoriels externes et dans certains neurones multidendritiques (Blochlinger et al., 1988 ; Blochlinger et al., 1990). L'anticorps anti-HRP se fixe aux membranes de tous les neurones des Ecdysozoaires (Jan et Jan, 1982 ; Haase et al., 2001). Il reconnaît l'épitope carboné α 1,3-fucosyl,N-glycane (Fabini et al., 2001 ; Snow et al., 1987), qui est associé à plusieurs glycoprotéines dont Nervana-2, une Na+ K+ ATPase

présente dans tous les neurones, et plusieurs molécules d'adhésion comme Fascicline I, Fascicline II, Neurotactin et Neuroglian (Desai et al., 1994 ; Sun et Salvaterra, 1995 ; Wang et al., 1994). Les neurones des organes chordotonaux sont facilement reconnaissables par le renflement HRP-positif présent à l'extrémité du dendrite. Les neurones des organes sensoriels externes se distinguent des neurones multidendritiques par la présence d'un point fortement HRP-positif à l'extrémité de leur unique dendrite. Le triple marquage Cut, HRP et Elav permet donc d'identifier à la fois toutes les cellules des organes sensoriels externes, tous les neurones multidendritiques et tous les neurones des organes chordotonaux.

Matériels et Méthodes

Espèces utilisées et Fixation des embryons

Les espèces que j'ai étudiées sont : *D. yakuba, D. bifasciata, D. busckii* 1, *Z. vittiger* (données par P. Santamaria) ; *D. bifurca, D. hydei, D. buzzatii, D. santomea* (données par D. Lachaise) ; *D. sechellia* et *D. malakotliana* (données par D. Stern) ; *D. ararama* (donnée par P. Simpson) ; *D. virilis* (donnée par J.-A. Lepesant), *D. busckii* 2 (donnée par Nicolas Gompel). Les embryons fixés de *Calliphora* et *Phormia* m'ont été gentiment fournis par Pat Simpson. Le protocole de fixation que j'ai utilisé pour les autres espèces est le même que pour *D. melanogaster* (voir annexe). Cependant, pour *Megaselia* et *D. hydei*, l'étape de déchorionnation dans l'eau de Javel doit durer plus de 5 minutes.

Immunohistochimie et analyse confocale

J'ai utilisé les anticorps primaires suivants : anti-Cut de souris (1/1000,2B10, DSHB), anti-Elav de rat (1/4, 7E8A10, DSHB), anti-HRP de lapin (1/500,Cappel). Pour *D. hydei*, *Calliphora, Phormia* et *Megaselia*, le signal Cut a été amplifié en utilisant le protocole décrit en annexe. Pour les autres espèces, j'ai utilisé les anticorps secondaires fluorescents suivants : anti-souris-Cy2 (1/400, Jackson Laboratories), anti-rat-Cy5 (1/400, Jackson Laboratories), anti-lapin-Alexa488 (1/1000, Molecular Probes). Les embryons ont été observés au microscope confocal Leica SP2. Pour chaque région abdominale (ventrale, latérale et dorsale), les segments d'au moins trois embryons différents ont été analysés.

Résultats

Un patron extrêmement conservé chez les Drosophilinae

Chez toutes les espèces de Drosophilinae analysées à l'exception de *D. busckii*, j'ai observé le même patron d'organes sensoriels que celui de *D. melanogaster*. Les organes sensoriels sont localisés exactement aux mêmes positions et présentent la même organisation (Fig. 2 et données non montrées). L'arbre phylogénétique établi par Remsen et O'Grady (Remsen et O'Grady, 2002 ; Fig. 1) suggère donc que le patron des organes sensoriels de *D*.

melanogaster était déjà présent chez l'ancêtre des Drosophilinae et qu'il a été conservé chez toutes les espèces analysées à l'exception de *D. busckii*.

La cellule pl suit un lignage md-solo à la position 4 chez D. busckii

Le patron de *D. busckii* est identique à celui de *D. melanogaster* sauf que l'organe sensoriel externe à la position 4 est absent (Fig. 2D-E). Deux lignées indépendantes de *D. busckii* présentent ce patron abdominal (Fig. 2D-E), l'une établie à partir d'une femelle récoltée aux Etats-Unis et l'autre à partir d'une femelle récoltée en France. Ce patron sensoriel est donc présent dans au moins deux populations de *D. busckii*.

Chez *D. melanogaster*, l'organe externe situé à la position 4 provient d'un lignage mdes qui produit également le neurone multidendritique vmd4, situé au sein du groupe des cinq neurones multidendritiques ventraux (Orgogozo et al., 2001 ; Fig. 5). Le neurone vmd4 semble présent chez *D. busckii* car comme chez *D. melanogaster*, le groupe de neurones multidendritiques ventraux de *D. busckii* comprend cinq neurones, dont le neurone Collier-



Fig. 1 - Arbre phylogénétique des espèces analysées. Cette phylogénie des Drosophilinae a été établie en combinant les données morphologiques et moléculaires de plusieurs travaux (Remsen et O'Grady, 2002). Les dates ont été estimées à partir des fossiles (Yeathes et Wiegmann, 1999). MA: millions d'années. Chaque couleur correspond à un patron d'organes sensoriels particulier.



Fig. 2 - L'organe vp4 manque chez *D. buckii.* Cellules sensorielles de la région abdominale ventrale chez *D. melanogaster* (A), *Zaprionus vittiger* (B), *D. malakotliana* (D) et deux lignées indépendantes de *D. buckii* (D-E). Cut est en rouge et Elav en bleu. Les neurones multidendritique du groupe ventral sont entourés en pointillés. La flèche indique la position 4 où l'organe externe manque chez *D. busckii*. Barre=5µm.



Fig. 3 - Le groupe de neurones multidendritiques ventraux de *D. buckii* est identique à celui de *D. melanogaster*. Cellules sensorielles de la région abdominale ventrale chez *D. melanogaster* (A) et *D. buckii* (B). Cut est en rouge, Elav en bleu et Collier en vert. Collier s'accumule dans les neurones multidendritiques vmd4a et vmd1a. Dans le groupe ventral de neurones multidendritiques, le neurone vmd1a est entouré en trait plein et les autres sont entourés en pointillés. La flèche indique la position 4 où l'organe externe manque chez *D. busckii*. Barre=5µm.



Fig. 4 - La cellule pI située à la position 4 suit un lignage md-es chez *D. melanogaster* et **un lignage md-solo chez** *D. buckii*. Cellules sensorielles de la région abdominale ventrale chez *D. melanogaster* (A-C) et *D. buckii* (D-G) au stade 11-12 (A-B,D-E), et à la fin du stade 13 (C,F-G). Cut est en rouge et Elav en bleu. Les schémas correspondant aux images confocales sont donnés à droite de chaque image. Les cellules Elav-positives sont en rose (neurones multiendritiques) ou en violet (pIIIb et ses descendants). Les cellules provenant d'un lignage md-solo sont entourées en bleu. Les deux cellules précurseurs de la position 4 sont légèrement l'une sur l'autre sur la figure B.

positif vmd1a (Fig. 3). Pour expliquer l'absence d'un organe externe mais la présence du neurone multidendritique qui lui est associé par lignage, nous pouvons imaginer que la cellule précurseur pI apparaît bien chez *D. busckii* mais qu'elle suit un lignage md-solo au lieu de suivre un lignage md-es, produisant ainsi une unique cellule, le neurone multidendritique. Pour tester cette hypothèse, j'ai observé les cellules précurseurs pI et leurs descendants dans la région ventrale d'embryons de *D. busckii* à différents stades de l'embryogenèse.

Pour déterminer les stades de développement des embryons de ces deux espèces, j'ai utilisé le niveau de rétraction de la bande germinale. Chez *D. melanogaster* et *D. busckii*, à la fin du stade 11, six groupes de une ou deux cellules précurseurs Cut-positives sont observées aux positions 1, 2, 3, 4, 4a et 1a (Fig. 4A-B,D-E). Une cellule pI apparaît donc bien à la position 4 chez *D. busckii*. Au stade 12, les deux cellules filles de pI sont observées à chaque position chez *D. melanogaster*. Par contre, chez *D. busckii*, une seule cellule Cut-positive est parfois détectée à la position 4. Cette cellule ne semble pas être une cellule pI qui ne s'est pas encore divisée car les cellules pI accumulent une quantité beaucoup plus faible de protéines Cut. Ceci suggère donc qu'une des deux cellules filles de pI est morte. Ensuite, au stade 13, quatre ou cinq cellules Cut-positives sont détectées à la position 4 chez *D. melanogaster* (Fig. 4C). Ces cellules sont les deux cellules soie et socle fortement Cut-positives, le neurone multidendritique Elav-positif et la cellule pIIIb ou ses deux cellules filles. Par contre, chez *D. busckii*, seulement une (Fig. 4G) ou deux (Fig. 4F) cellules Cut-positives sont observées à cette position. Ces cellules accumulent Elav et sont situées à la position du futur neurone multidendritique vmd4. Ce sont donc les cellules pIIIb et le neurone multidendritique vmd4.

En conclusion, une cellule précurseur pI apparaît bien à la position 4 chez *D. busckii*. Mes observations suggèrent que cette cellule précurseur suit un lignage md-solo La différence de lignage entre *D. melanogaster* et *D. busckii* à la position 4 conduit ainsi à la formation de deux patrons d'organes sensoriels différents (Fig. 5).

Les embryons de *D. busckii* sont deux fois plus petits que ceux des autres Drosophilinae

D'après l'arbre phylogénétique de la Fig. 1, si on privilégie le scénario le plus parcimonieux, le lignage md-es s'est transformé en un lignage md-solo à la position 4 au cours de l'évolution, et l'organe externe 4 a disparu. De façon remarquable, les embryons de *D. busckii* sont deux fois plus petits que ceux des autres Drosophilinae (Fig. 6 et données non montrées). Par contre, leurs cellules sensorielles ont à peu près la même taille (Fig. 1-2 et données non montrées). Il est donc possible qu'au cours de l'évolution, une réduction de la taille des embryons ait entraîné la perte de l'organe sensoriel à la position 4 : deux organes sensoriels externes trop proches seraient peut-être néfastes pour la larve (cuticule fragile localement, interférences au niveau des axones...). L'analyse du patron sensoriel d'embryons d'autres espèces ayant des tailles différentes devrait permetre de tester cette hypothèse. Les embryons de *D. malakotliana* ont une taille intermédiaire entre *D. busckii* et les autres Drosophilinae (Fig. 6) ; ils présentent le même patron sensoriel que *D. melanogaster* (Fig. 1).



Fig. 5 - La formation des organes sensoriels de la région abdominale ventrale chez *D. melanogaster* et chez *D. buckii.* Les cellules pI qui suivent le lignage md-solo sont en bleu et leur descendance est entourée d'un trait bleu. La flèche indique la position 4 où l'organe externe manque chez *D. busckii.*



Fig. 6 - Les embryons de *D. busckii* **sont deux fois plus petits que ceux de** *D. melanogaster.* Embryons entiers de *D. melanogaster, D. busckii* et *D. malakotliana* observés au même grossissement, marqués pour Cut (en rouge) et Elav (en bleu). La tête est vers le haut. La corde nerveuse ventrale du SNC est visible en bas sur chaque embryon.

L'ancêtre des Muscomorphes possédait un patron très semblable à celui de *D. melanogaster*

Pour savoir si le patron des organes sensoriels abdominaux est également conservé hors du groupe des Drosophilinae, j'ai analysé le patron de trois autres espèces beaucoup plus éloignées : deux Calliphoridés Calliphora vicina et Phormia terranovae, ainsi qu'une Phoridé Megaselia scalaris. Les patrons de ces trois espèces diffèrent des précédents. L'ancêtre commun de Megaselia scalaris et de D. melanogaster est l'ancêtre des Muscomorphes (Fig. 1 ; McAlpine, 1989). Les deux Calliphoridés présentent exactement le même patron abdominal (Fig. 7), indiquant que ce patron a été conservé depuis l'ancêtre commun des deux espèces. De plus, les patrons de Calliphora-Phormia et de Megaselia sont assez semblables à celui de D. melanogaster (Fig. 7). Le nombre d'organes chordotonaux est le même chez toutes les espèces et la plupart des cellules sensorielles de D. melanogaster peuvent être identifiées chez les trois espèces. Toutefois, il existe des différences concernant la position des différents organes sensoriels ainsi que la présence ou non de certains organes sensoriels externes et de certains neurones multidendritiques. En se basant sur la position relative des organes, on peut tenter d'identifier les organes manquants ou supplémentaires par rapport au patron de D. melanogaster. Cependant, dans les régions dorsale et ventrolatérale, l'identification est difficile car les cellules sensorielles ont des positions différentes. Une proposition des organes supplémentaires observés chez les trois espèces par rapport à D. melanogaster est indiquée sur la Fig. 7.

Discussion

Un patron sensoriel larvaire très stable au cours de l'évolution

Mes observations indiquent que le patron sensoriel abdominal larvaire n'a pas changé depuis l'ancêtre des Drosophilinae chez toutes les espèces analysées à l'exception de *D. busckii*. Mais dans les autres régions du corps des Muscomorphes, les patrons sensoriels sontils aussi stables que le patron abdominal de la larve ? Dans le sous-groupe d'espèces *melanogaster (D. melanogaster, D. sechellia, D. yakuba, D. santomea*), le patron des soies mécanosensorielles des palpes maxillaires, du génitalia du mâle et de l'ovipositeur de la femelle varie extrêmement selon les espèces (Ashburner, 1989). Chez *Zaprionus vittiger*, la répartition et la forme des soies fémorales sont totalement différentes du genre *Drosophila* (Fig. 35.12c de Ashburner, 1989). De plus, *Calliphora vicina* possède plus de macrochètes sur le thorax que *Phormia terranovae* (Skaer et al., 2002b). Toutes ces observations suggèrent donc que le patron sensoriel abdominal de la larve est resté beaucoup plus stable au cours de l'évolution que le patron sensoriel de l'aulte. Il semble donc que des contraintes plus fortes s'exercent sur le patron sensoriel de la larve.

Ces contraintes pourraient être liées à la fonction sensorielle du SNP abdominal de la larve. Les études anatomiques et morphologiques du SNP abdominal de la larve indiquent qu'il remplit probablement plusieurs fonctions sensorielles : proprioception (connaissance de la position des différentes parties du corps dans l'espace), toucher, évaluation de la température, goût et douleur. Si les contraintes sont sensorielles, on peut imaginer que le SNP



Fig. 7 - Schéma du patron des organes sensoriels d'un segment abdominal de *D. melanogaster,* **de** *Calliphora vicina* **et de** *Megaselia scalaris.* Le patron sensoriel de *Phormia terranovae* est identique à celui de *Calliphora*. Les cellules supplémentaires observées chez *Calliphora* et *Megaselia* sont entourées d'un trait noir épais. Les neurones multidendritiques Cut-positifs qui sont probablement issus d'un lignage md-solo sont entourés d'un trait bleu. Le nombre de neurones multidendritiques de la région dorsale n'a pas été déterminé avec certitude chez *Megaselia*. Les trois cellules entourées d'une parenthèse correspondent à un groupe de cellules Cut-positives qui n'est pas associé à un neurone. Ces cellules pourraient former une glande épidermique (V. Orgogozo, données non publiées).

abdominal de la larve s'est adapté et varie selon les différents milieux de vie. Pourtant, ce ne semble pas être le cas. Des larves de Drosophilinae avant le même patron sensoriel abdominal occupent des niches écologiques différentes (DeSalle, 1991 et introduction dans Remsen et O'Grady, 2002). Par exemple, les larves de D. sechellia sont attirées et mangent exclusivement le fruit de l'arbre Morinda toxifolia, qui est toxique pour les autres Diptères (Tsacas et Bachli, 1981 ; Lachaise, 1983). Les larves et les adultes de D. buzzatii et d'un grand nombre d'espèces du groupe de D. repleta mangent et vivent sur les cactus du genre Opuntia (introduction dans Fanara et al., 1999). Les autres espèces sont très cosmopolites et mangent des fruits ou des feuilles en décomposition. La plupart ont une préférence pour les fruits mais certaines, comme D. hydei, qui préfère les feuilles (Marie-Louise Carriou, communication personnelle). De plus, D. virilis et Zaprionus vittiger vivent dans des milieux plus froids que les autres espèces analysées. Le patron sensoriel abdominal larvaire ne semble donc pas varier en fonction du milieu de vie. Cependant, d'autres caractères du SNP non observés ici diffèrent peut-être entre ces espèces (morphologie cuticulaire externe des organes sensoriels, projection dans le système nerveux central, récepteurs présents à la surface des dendrites...). De plus, des différences existent peut-être dans d'autres régions de la larve (segments thoraciques, tête, extrémité postérieure, organes sensoriels associés au système digestif). Enfin, toutes les larves analysées ici se nourrissent de plantes en décomposition ou de champignons (Ashburner, 1989). Il serait intéressant d'analyser le SNP de larves de Drosophilidés parasites (Grimaldi et Nguyen, 1999) ou prédatrices d'insectes, d'araignées ou de grenouille (Ashburner, 1989) pour voir si ce patron est également conservé chez ces espèces.

D'autres facteurs que le milieu de vie semblent donc excercer une pression sur le patron sensoriel abdominal larvaire. Une des contraintes pourrait être développementale. En effet, de nombreux neurones sensoriels larvaires survivent à la métamorphose chez les Insectes et servent de guides pour les nouvelles projections axonales, que ce soit au sein de l'épithélium ou du SNC (Bate, 1976 ; Jan et al., 1985 ; Tix et al., 1989 ; Shepherd et Smith, 1996 ; Williams et Shepherd, 1999 ; Usui-Ishihara et al., 2000 ; Williams et Shepherd, 2002). Chez *D. melanogaster*, les neurones de la région abdominale ventrale et latérale qui subsistent au stade pupal sont représentés sur la Fig. A-3 en annexe (Williams et Shepherd, 1999). De façon remarquable, ces neurones sont présents chez toutes les espèces que j'ai étudiées (Fig. 7). Il est donc possible que la fonction des neurones larvaires au cours de la métamorphose exerce une contrainte forte sur le patron des organes sensoriels de la larve.

Le patron sensoriel de D. busckii

Mes observations indiquent que la cellule précurseur pI à la position 4 suit un lignage md-solo chez *D. busckii* alors qu'elle suit un lignage md-es chez *D. melanogaster*. Toutefois, je n'ai pas utilisé de marqueurs de cellules apoptotiques pour visualiser les cellules précurseurs en apoptose à la position 4 chez *D. busckii*. Le marquage TUNEL ne paraît pas approprié pour observer la mort des cellules précurseurs sensorielles. En effet, il marque des noyaux fragmentés qui ont déjà migré et qui ont perdu le marquage Cut chez *D. melanogaster* (V. Orgogozo, observations personnelles). Dans le lignage md-solo décrit chez *D.*

melanogaster, les deux cellules qui entrent en apoptose expriment les gènes pro-apoptotiques *reaper* et *grim* (Orgogozo et al., 2002). Un anticorps anti-Reaper vient d'être fabriqué chez *D. melanogaster* (Olson et al., 2003). J'espère donc pouvoir l'utiliser chez *D. busckii*.

L'arbre phylogénétique de la Fig. 1 indique que le changement de patron sensoriel a eu lieu dans la branche qui a conduit à *D. busckii*. Mais à quel moment au cours de l'évolution ? Comme le patron de *D. busckii* a été observé chez deux lignées indépendantes, il est probablement caractéristique de l'espèce. Cependant, l'étude d'autres lignées prélevées à différents endroits du globe est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. *D. busckii* fait partie du sous-genre *Dorsilopha*. Deux autres espèces appartenant à ce sous-genre ont été décrites (Ashburner, 1989) mais à ma connaissance, elles ne sont pas maintenues en laboratoire. De plus, aucune espèce relativement proche du sous-genre *Dorsilopha* n'a été clairement identifiée car la position de *D. busckii* au sein de l'arbre des Drosophilinae semble encore très contestée aujourd'hui. Ainsi, étant donné le peu de connaissances disponibles pour l'instant sur les espèces proches de *D. busckii*, il semble difficile d'estimer à quel moment le changement de patron sensoriel a eu lieu.

Si on privilégie le scénario le plus parcimonieux, d'après l'arbre phylogénétique de la Fig. 1, le lignage md-es s'est transformé en un lignage md-solo à la position 4 au cours de l'évolution, conduisant à la disparition de l'organe externe 4 dans la branche qui a conduit à *D. busckii*. Cependant, on peut remarquer que chez les Calliphoridés examinées et chez *Megaselia*, il semblerait que l'organe externe 4 soit absent également, alors que son neurone multidendritique associé est présent (Fig. 7). Si tel est le cas, deux hypothèses sont envisageables : soit l'arbre phylogénétique de la Fig. 1 est faux et *D. busckii* a émergé entre les Calliphoridés et les Drosophilinae examinés (la perte de l'organe 4 serait donc ancestrale), soit l'organe 4 a été perdu plusieurs fois de façon indépendante au cours de l'évolution (l'absence de l'organe 4 serait une convergence).

Comment identifier maintenant la (ou les) mutation responsable du changement observé chez D. busckii ? Une approche est d'identifier des gènes candidats chez D. melanogaster et de les tester ensuite chez D. busckii. Le problème revient donc à élucider les mécanismes moléculaires qui distinguent le lignage md-es du lignage md-solo. De manière simple, on peut imaginer qu'il existe un gène sélecteur du type cut ou pox-neuro qui contrôle la différence entre les lignages md-es et md-solo. Si un tel gène existe, il doit être exprimé seulement dans les cellules précurseurs suivant un lignage md-solo, ou inversement. Un moyen de l'identifier semble donc de cribler les banques disponibles de patrons d'expression dans l'embryon (banque FlyView d'éléments P¹; banque Fruitfly de patrons d'expression in situ²). Si un tel gène existe, cette méthode a des chances d'aboutir. D'ailleurs, c'est grâce à son patron d'expression que le gène pox-neuro a été identifié (Bopp et al., 1989 ; Dambly-Chaudière et al., 1992). Mais il est également possible qu'un tel gène n'existe pas. Par exemple, on peut imaginer que la mutation responsable du changement a eu lieu dans le promoteur du gène reaper, qui répond alors différemment à son contexte à la position 4. Dans ce cas, l'identification de la ou les mutation(s) responsable(s) du changement s'avère très difficile...

¹ http://flyview.uni-muenster.de/

² http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl

DISCUSSION ET CONCLUSION

XXIème siècle!: un seul lignage canonique pour divers organes sensoriels

Pour moi, l'apport le plus important de ma thèse est d'avoir découvert la séquence canonique de divisions cellulaires cachée au sein des nombreux lignages sensoriels chez *D. melanogaster*. Pour plusieurs organes sensoriels, chacune des divisions successives du lignage a été observée. Ces lignages sont représentés sur la figure 17. Les quatre premiers lignages possèdent la séquence canonique de divisions. Par contre, les deux derniers sont relativement différents. Ils correspondraient peut-être à des portions du lignage canonique (voir article 4).



Fig. 17 - Lignages sensoriels qui ont été proposés à partir de l'observation des divisions successives.

L'analyse des données disponibles dans la littérature m'a permis également de proposer des modèles de lignage pour d'autres organes sensoriels. Ces lignages sont représentés sur la figure 18.



Fig. 18 - Autres lignages sensoriels proposés à partir des données disponibles dans la littérature.

Les lignages des organes chordotonaux

Les arguments en faveur du lignage proposé pour les scolopidies de l'organe de Johnston, pour les scolopidies à cinq cellules de l'organe chordotonal larvaire lch5 et pour les

papilles non glycogéniques de l'aile sont détaillés dans l'article 4. L'organe chordotonal larvaire lch5 est composé de cinq scolopidies (Fig. A-1 en annexe). Parmi ces scolopidies, deux possèdent cinq cellules différentes qui sont : cellule ligamentaire, neurone, cellule scolopale, cellule cap et cellule d'attachement (Hartenstein, 1988 ; Ghysen et O'Kane, 1989 ; Matthews et al., 1990 ; Brewster et Bodmer, 1995). Par contre, pour l'ensemble de l'organe lch5, seulement deux cellules d'attachement sont observées (Matthews et al., 1990). Ceci suggère que les trois autres scolopidies sont dépourvues de cellule d'attachement et sont constituées de quatre cellules seulement. Les cinq scolopidies de l'organe lch5 sont formées par cinq cellules précurseurs pI différentes. Les deux scolopidies antérieures sont formées par deux cellules pI qui apparaissent au sein d'un groupe proneural alors que les trois autres sont issues de cellules pI recrutées par la cellule pI la plus ventrale via un signal Spitz/EGF (zur Lage et al., 1997 ; résumé dans Gould et al., 2001). Quelles sont donc les scolopidies à cinq cellules ? Dans les mutants *rhomboid*, la voie de signalisation Spitz-EGF est abolie et les trois cellules pI précurseurs des scolopidies postérieures ne sont pas recrutées (zur Lage et al., 1997, Okabe et Okano, 1997). Dans ces conditions, seules les deux scolopidies antérieures sont présentes (zur Lage et al., 1997, Okabe et Okano, 1997) et les deux cellules d'attachement sont toujours observées (Véronique Brodu, communication personnelle). Ce sont donc les deux scolopidies antérieures qui possèdent cinq cellules. Deux lignages (au moins) sont possibles pour les trois scolopidies postérieures constituées de quatre cellules : soit la cellule d'attachement meurt par apoptose, soit la cellule pIIa ne se divise pas et se différencie directement en cellule cap. En absence d'apoptose, dans les mutants Df(1)H99, aucune cellule atonal-lacZ-positive supplémentaire n'est observée (Véronique Brodu, communication personnelle). Ce résultat est donc en faveur de la deuxième hypothèse (Fig. 18).

Les organes chordotonaux larvaires de la région ventrale vch1&2 ne possèdent pas non plus de cellule d'attachement (Matthews et al., 1990 ; Brewster et Bodmer, 1995). Ces organes semblent aussi dépourvus de cellule ligamentaire. En effet, aucun marqueur de cellule ligamentaire (Repo, Glial cell missing, Wrapper) n'est détecté dans cette région (Xiong et al., 1994; Campbell et al, 1994; Jones et al, 1995, Halter et al, 1995; Noordermeer et al, 1998). De plus, l'obtention de clones aléatoires de cellules marquées exprimant le gene *lacZ* indiquent que, contrairement aux scolopidies de lch5, le groupe de cellules sensorielles l'organe chordotonal vch1 ou vch2 ne comporte jamais de cellule ligamentaire (Brewster et Bodmer, 1995). En fait, les cellules sensorielles de vch1 ou vch2 sont souvent marquées en même temps qu'un neurone multidendritique: le neurone multidendritique v'td1 ou v'td2 (Brewster et Bodmer, 1995). Il semble donc probable que le lignage des organes chordotonaux vch1 ou vch2 soit un lignage canonique dans lequel la cellule correspondant à la cellule ligamentaire/cellule gliale/neurone multidendritique du lignage canonique est un neurone multidendritique (Fig. 18). Ce modèle de lignage est tout à fait en accord avec les resultats obtenus par incorporation de BrdU (Bodmer et al., 1989).

En conclusion, les scolopidies de *D. melanogaster* semblent produites au cours du développement par au moins quatre lignages différents. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent les différences entre ces lignages sont totalement inconnus.
Les soies interommatidiales

Les soies interommatidiales sont composées de deux cellules seulement au stade adulte : le neurone et une cellule associée (Perry, 1968). Pourtant, au cours du développement des soies interommatidiales, à 70h après formation de la pupe, quatre cellules – soie, socle, neurone, gaine – sont observées (Cagan et Reddy, 1989). En accord avec le lignage canonique, les marquages par incorporation de BrdU indiquent que les cellules neurone et gaine sont sœurs (Cagan et Reddy, 1989). Les cellules soie et socle produisent alors les structures cuticulaires de l'organe visibles à la surface de l'œil (Cagan et Reddy, 1989), puis au moins une des cellules du groupe entre en apoptose (Perry, 1968). Toutes ces observations suggèrent donc qu'au cours du lignage des soies interommatidiales, deux cellules accessoires meurent par apoptose. Comme la cellule accessoire qui ne meurt pas est associée au neurone, ce doit être la cellule gaine (Fig. 19).

Si le lignage des soies interommatidiales suit bien un lignage canonique, des cellules supplémentaires de type cellule gliale/neurone multidendritique doivent également être produites. Effectivement, les cellules gliales subrétinales décrites par Cagan et Reddy sont probablement produites par le lignage des soies interommatidiales (Cagan et Reddy, 1989). Ces cellules apparaissent au bon moment à partir de l'épithélium rétinal et sont Repopositives (Cagan et Reddy, 1989 ; Xiong et al., 1994). Elles sont différentes des cellules gliales basales de la rétine (Choi et Benzer, 1994). Les cellules gliales basales de la rétine proviennent de l' « optic stalk » (Choi et Benzer, 1994). Elles ne sont pas requises pour la croissance des axones des photorécepteurs hors de la rétine mais sont nécessaires pour l'entrée dans l'« optic stalk » (Rangarajan et al., 1999). Les cellules gliales subrétinales pourraient donc peut-être contrôler la migration des axones hors de la rétine. Cette hypothèse est facilement testable en réalisant des clones mutants *scute*, dans lesquels les soies interommatidiales sont absentes alors que le reste de l'œil est normal (Sun et al., 2000). De plus, cette question est très intéressante du point de vue évolutif car les yeux des moustiques ne possèdent pas de soies interommatidiales.

Les écailles des ailes des papillons

Le lignage canonique est probablement présent chez les papillons (article 4). Les écailles des ailes des papillons sont constituées de deux cellules différentes : une cellule de l'écaille et une cellule socle (Fig. 1). La formation des écailles est un modèle d'étude du développement très accessible qui a été beaucoup étudié dans les années 30-60 (voir introduction). En effet, toutes les écailles se forment en même temps au sein du disque imaginal d'aile, à partir de cellules précurseurs bien espacées. Le lignage des écailles est dessiné sur la figure 1. La division de la cellule pI a lieu perpendiculairement au plan de l'épithélium. Elle ressemble donc à la division de la cellule pIIb du lignage canonique. Elle donne une petite cellule basale qui meurt par apoptose et une grosse cellule apicale qui se divise pour produire les deux cellules de l'écaille. En se basant sur le destin des cellules filles, qui correspondent aux cellules soie et socle des organes externes, il a été proposé que la cellule pI de l'écaille correspond à la cellule pI du lignage canonique et que c'est la cellule

pIIb qui entre en apoptose (Galant et al., 1998). Cependant, si on se base sur l'orientation des divisions, qui semble relativement stéréotypée au sein des lignages sensoriels de *D*. *melanogaster* (article 4), on peut penser que la cellule pI de l'écaille possède des caractères de cellule pIIb et donc que les cellules de l'écaille correspondent plutôt au neurone et à la gaine. En fait, je pense que la vérité est un mélange de ces deux modèles : la cellule pI de l'écaille correspond probablement à la fois à une cellule pI et à une cellule pIIb du lignage canonique. Steve Paddock, dans le laboratoire de Sean Carroll, est en train d'analyser la correspondance entre les cellules précurseurs du lignage de l'écaille et celles du lignage canonique en utilisant toute une batterie d'anticorps permettant de distinguer les différentes cellules précurseurs (en particulier les anticorps dirigés contre les protéines : Inscuteable, Prospero, Elav, Su(H), Numb et Pins).

L'engrenage moléculaire caché au sein de chaque lignage

L'existence du lignage canonique met en évidence une séquence temporelle de différenciation cellulaire. Cette séquence est la suivante. Premièrement, la cellule pI réorganise sa polarité épithéliale et se divise avec une polarité planaire. Ensuite, la cellule fille qui reçoit Numb (pIIb) se met à accumuler Inscuteable et se divise perpendiculairement au plan de l'épithélium. Sa cellule sœur (pIIa) se divise un peu plus tard dans le plan de l'épithélium, en suivant l'orientation de la division de la cellule pI, et elle produit les deux cellules les plus externes de l'organe sensoriel. Enfin, la cellule pIIIb se divise. Elle n'accumule plus Inscuteable et génère le neurone sensoriel et la cellule accessoire qui l'entoure.

Il doit donc exister un programme caché au sein des lignages sensoriels qui contrôle cette séquence temporelle d'événements. De façon assez similaire, des cellules différentes sont produites séquentiellement suite aux divisions cellulaires d'un groupe de cellules précurseurs lors de la somitogenèse chez les Vertébrés (résumé dans Dale et Pourquié, 2000) et lors de la segmentation chez les sangsues et les insectes à bande germinative courte (résumé dans Salazar-Ciudad et al., 2003). Cependant, très peu de molécules contrôlant ces séquences temporelles ont été mises en évidence (résumé dans Dubrulle et Pourquié, 2002).

Les neuroblastes du SNC de *D. melanogaster* produisent aussi différentes cellules filles de façon séquentielle au cours du temps. Cinq phases successives ont été identifiées (résumé dans Brody et Odenwald, 2002). Elles sont caractérisées par l'accumulation de différents facteurs de transcription : Hunchback, puis Krüppel, puis Pdm, puis Castor, puis Grainyhead. Tout d'abord, le gène *hunback* est exprimé par les neuroblastes qui délaminent et au cours de leur première division. Les cellules qui sont alors produites par le neuroblaste maintiennent l'expression du gène *hunback*, qui est requis pour leur différenciation. Ensuite, le neuroblaste arrête l'expression du gène *hunback* et active celle du gène *Krüppel…*et ainsi de suite. Des interactions croisées entre les différents gènes permettent de contrôler la progression correcte de la séquence de différenciation. En effet, chaque facteur de transcription active l'expression du prochain mais réprime celui d'après. Par exemple, Hunback active l'expression de *Krüppel*, mais réprime l'expression de *Pdm*, de telle sorte que l'expression de *Pdm* n'est pas activée par *Krüppel*. Les mécanismes qui permettent le passage

d'une phase à une autre, en arrêtant l'expression d'un facteur de transcription, n'ont pas encore été identifiés. La succession Hunchback>Krüppel>Pdm>Castor a été observée notamment pour les neuroblastes 2-4, 7-1, 7-3 et 7-4 (Isshiki et al., 2001). Pour d'autres neuroblastes (2-1, 3-3, 5-1 et 6-1), certaines étapes manquent et la séquence temporelle commence par Krüppel, Pdm ou Castor (Isshiki et al., 2001).

Ce modèle très attrayant contrôle peut-être aussi les séquences temporelles des lignages sensoriels de *D. melanogaster*. Pour le savoir, j'ai analysé le patron d'accumulation de Hunchback, Krüppel, Pdm, et Castor dans les lignages sensoriels de l'embryon alors que Pierre Fichelson, dans le laboratoire de Michel Gho, a réalisé les mêmes marquages en parallèle dans le lignage des microchètes du thorax. Malheureusement, nous n'avons pas observé d'expression temporelle restreinte à certaines cellules précurseurs au cours de ces deux lignages (données non publiées). Il semble donc que les mécanismes moléculaires impliqués soient différents.

Le gène *hamlet* pourrait contrôler une partie de la séquence du lignage sensoriel. Dans le lignage des organes sensoriels externes de l'embryon, il est exprimé uniquement dans la cellule pIIIb et ses deux cellules filles : le neurone sensoriel et la cellule gaine (Moore et al., 2002). De plus, il est exprimé dans la cellule pIIIb du lignage md-solo et du lignage des microchètes du thorax, ainsi que dans le lignage des organes chordotonaux (A. Moore, communication personnelle). Dans les mutants hamlet, le neurone de l'organe sensoriel externe est transformé en neurone multidendritique, indiquant que hamlet contrôle la décision neurone multidendritique/neurone d'un organe sensoriel externe (Moore et al., 2002). Mais on peut aussi imaginer qu'hamlet contrôle en fait la transition pIIb>pIIIb, et que dans les mutants hamlet, la cellule pIIIb reste une cellule pIIb. En effet, dans les mutants hamlet, la cellule pIIIb a conservé des caractères de cellule pIIb car elle a produit un neurone multidendritique comme la cellule pIIb. Dans ce cas, dans les mutants hamlet, l'autre cellule fille de pIIIb (qui est normalement une cellule gaine) devrait être une cellule pIIIb. Cependant, avec le seul marqueur disponible pour la cellule gaine (accumulation d'une grande quantité de Prospero), la cellule gaine semble normale dans les mutants hamlet. Ainsi, s'il s'avère que le gène hamlet est impliqué dans la transition pIIb>pIIIb, il ne semble pas contrôler toutes les caractéristiques de la cellule pIIIb.

D'autres molécules contrôlent vraisemblablement la séquence temporelle des événements du lignage canonique, mais elles sont pour le moment inconnues. Une méthode pour les identifier serait d'étudier les lignées enhancer-trap décrites par Volker Hartenstein et Yuh Nung Jan qui sont exprimées à la fois dans les organes sensoriels externes et internes dans seulement une partie des cellules sensorielles (Hartenstein et Jan, 1992). Au moins 20 lignées différentes montrent ce patron d'expression particulier. Comme la position des éléments P au sein du génome peut être déterminée rapidement, l'identification des gènes présentant ces patrons d'expression semble relativement facile.

L'identification des gènes responsables des changements morphologiques apparus au cours de l'évolution

Au cours de mon projet sur l'évolution du patron sensoriel chez les larves de Muscomorphes, je me suis rendu compte que l'arbre phylogénétique de ces espèces était très mal connu. Pourtant, l'étude moléculaire des changements morphologiques qui ont eu lieu au cours de l'évolution se base totalement sur un arbre phylogénétique. Si l'arbre est faux, les conclusions avancées seront fausses. De plus, l'identification des gènes potentiellement responsables des changements observés est biaisée car elle repose essentiellement sur les gènes candidats mis en évidence chez *D. melanogaster*. L'étude de lignées ou espèces très proches qui peuvent se croiser entre elles permet de palier à ce problème. En effet, par cartographie génétique, en réalisant des croisements et en utilisant des marqueurs répartis sur tout le génome, on peut déterminer la région génomique qui contrôle un trait morphologique donné présent dans une lignée et absent dans l'autre. Cette technique présente un énorme avantage car on ne fait pas d'hypothèses a priori sur le gène impliqué dans le changement morphologique. Au cours de mon post-doc, j'espère pouvoir utiliser à profit cette technique pour identifier les gènes responsables des changements morphologiques observés au sein des espèces du sous-groupe *melanogaster*.

ANNEXE

Les organes sensoriels de la larve

La première description détaillée des organes sensoriels de la larve de *D*. *melanogaster* a été réalisée par Hertweck en 1931. Les suivantes, fondées sur l'étude de larves de 1^{er} stade larvaire (Lohs-Schardin et al., 1979) ou de 3^{ème} stade larvaire (Kankel et al., 1980), sont très semblables à celle de Hertweck. Le patron des organes sensoriels des larves de 3^{ème} stade larvaire est pratiquement identique à celui observé dans des embryons tardifs de stade 16 (Dambly-Chaudière et Ghysen, 1986, Campos-Ortega et Hartenstein, 1997). La position relative des cellules sensorielles au sein de l'animal change légèrement entre la fin de l'embryogenèse et le 3^{ème} stade larvaire (Fig. A-3). Les axones s'allongent, les corps cellulaires des cellules sensorielles migrent plus ou moins les uns par rapport aux autres. Suite à chaque mue, la soie et le socle sont à nouveau sécrétés par les cellules soie et socle des organes sensoriels externes.

L'organisation des organes sensoriels est exactement la même dans chacun des sept segments abdominaux A1 à A7 (Fig. A-1). C'est le patron des organes sensoriels larvaire le mieux connu. Celui des segments thoraciques T1-T3 est aussi relativement bien connu. Les premières descriptions des segments abdominaux ont été modifiées au fil des années. Par exemple, les neurones multidendritiques ont tout d'abord été considérés comme des neurones sans dendrite car l'anticorps 21A utilisé pour marquer les dendrites ne reconnaît pas les dendrites des neurones multidendritiques (Ghysen et al., 1986). Ainsi, leur première appellation a été « nd neuron » pour « no dendrite neuron » avant de devenir « md neuron » pour « multidendritiques profonds lbd et istd n'avaient pas été observés et l'organe poly-innervé dh1 était décrit comme un organe mono-innervé.

Une multitude de schémas du SNP abdominal de l'embryon ont été publiés et ils sont tous légèrement différents. Dans tous (dont les miens !), il manque au moins un neurone multidendritique dans la région dorsale. En effet, j'ai observé douze neurones dans la région dorsale (Fig. 3A' dans Orgogozo et al., 2002). En confrontant nos observations, Wesley Grueber et moi avons pu élaborer un nouveau schéma de tous les neurones du SNP abdominal de la larve (Fig. A-1). Ce nouveau schéma permet d'homogénéiser tous les travaux précédemment publiés.

Les régions postérieures (Fig. A-2) et antérieures de la larve restent aujourd'hui moins bien connues, bien qu'elles aient tout de même été l'objet d'analyses détaillées.

Références!:

Description de l'ensemble du SNP de la larve : Hertweck, 1931 Lohs-Schardin et al., 1979 Kankel, 1980 Campos-Ortega et Hartenstein, 1985

Hartenstein et Campos-Ortega, 1986 Dambly-Chaudière et Ghysen, 1986

Bodmer et Jan, 1987

Hartenstein, 1988 Kuhn, 1992a Campos-Ortega et Hartenstein, 1997

Description concernant seulement la région postérieure : Chu-wang et Axtell, 1972a (chez *Musca domestica*)

Chu-wang et Axtell, 1972a (chez *Musca domestica*) Turner et Mahowald, 1979 Denell et Frederick, 1983 Whittle et al., 1986 Sato et Denell, 1986 Jürgens, 1987 Kuhn, 1992b

Description concernant seulement la région antérieure:

Chu-wang et Axtell, 1972b (chez *Musca domestica*) Turner et Mahowald, 1979 Denell et Frederick, 1983 Jurgens et al., 1986



Fig. A-1 - Les organes sensoriels des segments abdominaux A1-A7 chez la larve. (A) Schéma des organes sensoriels externes présents à la surface de la cuticule d'un hémisegment. (B) Schéma des cellules sensorielles. Les noms des neurones sont en italique. Différentes nomenclatures sont utilisées dans la littérature, celle employée dans cette thèse est en gras.



nom	caractéristiques	développement	
papille mono-innervée vp1, vp2, vp4, lp2, dp1, dp2		lignage md-es pour les organes vp1, vp2, vp4, et aussi probablement pour les autres (Orgogozo et al., 2001). Les neurones multidendritiques associés à vp1, vp2 et vp4 sont respectivement : vmd1, vd2 et vmd4. Ceux associés à lp2, dp1 et dp2 seraient respectivement : istd, ddaF et ddaD.	
papille mono-innervée vp3	Sa cellule sole ou socle accumule Runt (observations personnelles). La cellule socle visualisée avec le gène rapporteur $Su(H)$ -GFP (Barolo et al., 2000) émet de très nombreux prolongements cytoplasmiques, contrairement aux autres cellules socles (observations personnelles).	lignage md-es (Orgogozo et al., 2001). D'après sa position, le neurone multidendritique associé à vp3 est probablement vbd (Fig. 6 de Orgogozo et al., 2001).	
papille mono-innervée vp4a	Elle est enfoncée dans une petite fente de la cuticule (Dambly-Chaudière et Ghysen, 1986).	lignage md-es. Son neurone multidendritique associé est v'ada (Orgogozo et al., 2001).	
soie mono-innervée lh2, lh1		lignage md-es (Orgogozo et al., 2001) probablement. D'après leurs positions, les neurones multidendritiques associés par lignage à lh2 et lh1 pourraient être respectivement ldaA et ldaB.	
papille poly-innervée vp5	innervée par deux neurones. Un des deux neurones accumule spécifiquement Senseless au stade 16-17 (observations personnelles). Structure cuticulaire plus renflée que les autres papilles (Dambly- Chaudière et Ghysen, 1987).	lignage inconnu. Dans les mutants <i>pox- neuro</i> , cet organe et son neurone multidendritique associé v'pda sont transformés en une soie mono-innervée et son neurone multidendritique associé (Dambly-Chaudière et al., 1992 ; Awasaki et Kimura, 2001).	
soie poly-innervée dh1	innervée par deux neurones.	lignage inconnu. Dans les mutants <i>pox- neuro</i> , cet organe est transformé en une papille mono-innervée localisée dans la région latérale (Awasaki et Kimura, 2001).	
organe chordotonal lch5	formé par cinq scolopidies. Les deux scolopidies antérieures ont cinq cellules (cellule d'attachement, cellule cap, cellule scolopale, neurone, cellule ligamentaire). Les trois scolopidies les plus postérieures n'ont pas de cellule d'attachement. Contrairement aux autres organes chordotonaux abdominaux, toutes les cellules de cet organe	Chaque scolopidie est formée à partir d'une cellule précurseur pI. Trois cellules pI <i>atonal</i> -positive apparaissent tout d'abord dans la région. Elles produiront les trois scolopidies antérieures, la plus dorsale produisant la plus antérieure. La cellule pI ventrale recrute également deux autres cellules pI, qui donneront les deux scolopidies postérieures (résumé dans Gould et al., 2001). Le lignage suivi par les cellules pI des deux scolopidies antérieures est	

Organes sensoriels des segments abdominaux A1-A7

	accumulent Engrailed, (Brewster et al., 2001).	sûrement celui proposé dans Brewster et al., 1997. Un lignage pour les trois autres scolopidies est proposé en discussion	
organe chordotonal	Chaque organe est forme par	Un lignage est propose en discussion.	
lch1, vch1, vch2	une seule scolopidie. Chaque		
	organe comprend trois cellules :		
	cellule cap, cellule scolopale et		
	neurone. Les neurones de ces		
	trois organes sont les seuls du		
	SNP à accumuler Paired		
	(observations personnelles).		
neurone multidendritique	Il émet seulement deux longs	lignage md-es. Son organe externe	
vbd	prolongements dendritiques	associé est vp3 (Orgogozo et al., 2001).	
	(Bodmer et Jan, 1987). Sa		
	projection dans le SNC est		
	différente de celle des autres		
	neurones multidendritiques.		
neurone multidendritique	Il émet deux longs	Ce neurone est toujours Cut-négatif mais	
lbd	prolongements dendritiques le	d'anrès Iarman et al 1993a il	
104	long du muscle 8 (Williams et	dépendrait des gènes du complexe	
	Shepherd 1999) Il forme à lui	achaete-scute, Augune accumulation de	
	tout soul le parf transverse qui	BrdU n'a átá observás dans ce neurone	
	so projetto dong la SNC C'est	(Padmar at al. 1080) suggérant que sos	
	le goul nourone	(Bounier et al., 1989), suggerant que ses	
	ne seur neurone multiden dritique du SNID	centres precurseurs sont trop protondes	
	multidendritique du SNP	pour incorporer le Brau ou bien qu'il est	
	abdominal qui accumule	forme directement par une cellule pl	
	Engrailed avec dda1 (Brewster	sans division cellulaire.	
1.1 1 1	et al., 2001).		
neurone multidendritique	Il émet deux longs	Il depend d'amos. Lignage simple	
dbd	prolongements dendritiques le	constitue d'une seule division	
et sa cellule gliale	long du muscle 3 (Williams et	asymetrique. Cette division depend de	
associée	Shepherd, 1998) qui se	numb, Notch et gcm (Brewster et	
	rejoignent d'un segment à	Bodmer, 1995 ; Jones et al., 1995 ;	
	l'autre (Bodmer et Jan, 1987).	Umesono et al., 2002). La voie Notch	
	Une construction rapporteur	est activée dans la cellule gliale.	
	<i>lacZ</i> sous le contrôle du	L'interprétation de ce lignage est donné	
	promoteur du gène <i>derailed</i> est	dans l'article 4. Pdm-1/Nubbin	
	exprimé uniquement dans une	s'accumule dans la cellule précurseur pI	
	cellule du SNP : la cellule gliale	et ses descendants (Umesono et al.,	
	associée au dbd (Bonkowsky et	2002).	
	Thomas, 1999). Pdm-1/Nubin		
	s'accumule uniquement dans ce		
	neurone et le neurone dda1		
	(Brewster et al., 2001).		
neurone multidendritique	Il est assez profond. C'est le	Il dépend d'amos (Brewster et al., 2001).	
dda1	seul neurone multidendritique	Lignage simple constitué d'une seule	
	du SNP abdominal qui	division asymétrique (Umesono et al	
	accumule Engrailed avec lbd	2002) Nubbin s'accumule dans la	
	(Brewster et al. 2001) Pdm-	cellule précurseur pI et ses descendants	
	1/Nubin s'accumule	(Umesono et al. 2002) La cellule sœur	
	uniquement dans ce neurone et	du neurone accumule transitoirement	
	la neurone dhd (Previster et al	acm (Umasono et al. 2002). Son devenir	
	2001)	est inconnu	
	2001).	est meoninu.	

neurone multidendritique vmd1a, vmd4a, ddaC	Ces trois neurones sont les seuls du SNP à accumuler trois marqueurs : Collier (M. Crozatier et A. Vincent, communication personnelle), Pick-pocket (Adams et al., 1998) et la β -galactosidase dans la lignée enhancer-trap <i>B6-2-25</i> (observations personnelles). Ils présentent une arborisation dendritique très complexe non chevauchante au sein de l'épithélium. Ils forment les neurones multidendritiques de classe IV (Grueber et al., 2002).	lignage md-es pour vmd4a (Orgogozo et al., 2001), lignage md-solo pour vmd1a (Orgogozo et al., 2002). Dans les mutants <i>hamlet</i> , le neurone vmd4a est dupliqué (Moore et al., 2002) alors que le neurone vmd1a ne l'est pas (W. Grueber, communication personnelle). Ceci suggère que les neurones issus d'un lignage md-solo ne sont pas dupliqués dans les mutants <i>hamlet</i> . Ainsi, d'après le phénotype des mutants <i>hamlet</i> , le neurone ddaC pourrait suivre un lignage md-solo (W. Grueber, communication personnelle).
neurone multidendritique vpda	Il présente un long dendrite sur lequel se branchent d'autres longs dendrites. Cette caractéristique le range parmi les neurones multidendritiques de classe I (Grueber et al., 2002).	Il dépend d' <i>atonal</i> (Jarman et al., 1993a). Aucune accumulation de BrdU n'a été observée dans ce neurone (Bodmer et al., 1989), suggérant que ses cellules précurseurs sont trop profondes pour incorporer le BrdU ou bien qu'il est formé directement par une cellule pI sans division cellulaire.
neurone multidendritique ddaD, ddaE	Ils présentent chacun un long dendrite sur lequel se branchent d'autres longs dendrites et forment avec vpda les neurones multidendritiques de classe I (Grueber et al., 2002). Contrairement à vpda qui est Cut-négatif, ces deux neurones accumulent transitoirement Cut (observations personnelles).	Ils dépendent des gènes du complexe <i>achaete-scute</i> (Dambly-Chaudière et Ghysen, 1987). D'après le phénotype des mutants <i>hamlet</i> , le neurone ddaD suivrait un lignage md-es alors que le neurone ddaE suivrait un lignage md- solo (W. Grueber, communication personnelle).
neurone multidendritique vmd2, vmd4, ldaA, ddaB	Leur arborisation dendritique est constituée de longs dendrites peu ramifiés. Ils forment les neurones multidendritiques de classe II (Grueber et al., 2002).	Lignage md-es pour les neurones vmd2 et vmd4 (Orgogozo et al., 2001). Le neurone vmd2 est associé à l'organe externe vp2 et vmd4a à l'organe externe vp4a. D'après sa position, le neurone ldaA doit être associé par lignage à l'organe externe lh2. D'après le phénotype des mutants <i>hamlet</i> , le neurone ddaB suivrait un lignage md- solo (W. Grueber, communication personnelle).
neurone multidendritique vmd1, ldaB, ddaA, ddaF	Leurs dendrites présentent de nombreuses petites branches terminales. Ils font partie des neurones multidendritiques de classe III avec v'pda (Grueber et al., 2002). Comme v'pda, ils accumulent une plus grande quantité de Cut que les autres neurones multidendritiques (Grueber et al., 2003).	Lignage md-es pour le neurone vmd1 (Orgogozo et al., 2001). D'après le phénotype des mutants <i>hamlet</i> , les neurones ddaA et ddaF suivraient un lignage md-es (W. Grueber, communication personnelle). D'après sa position, le neurone ldaB doit être associé par lignage à l'organe externe lh1.

neurone multidendritique	Ses dendrites présentent de Comme il est toujours à côté des deux		
v'pda	nombreuses petites branches	neurones qui innervent l'organe vp5, il	
	terminales. Il fait partie des	est probablement associé par lignage à	
	neurones multidendritiques de	cet organe.	
	classe III (Grueber et al., 2002).		
neurone multidendritique	Ces deux neurones sont	Ils dépendent d'atonal (Jarman et al.,	
vtd1, vtd2	associés à la trachée (Bodmer et	1993a). Ils pourraient provenir d'un	
	Jan, 1987). L'un des deux	lignage md-ch et être associé auxorganes	
	accumule Senseless	chordotonaux vch1 et vch2, qui n'ont	
	tardivement (observations	pas de cellule ligamentaire.	
	personnelles). Ces neurones ne		
	projettent pas comme les autres		
	neurones du SNP dans le		
	segment abdominal où ils sont		
	formés mais ils vont tous		
	jusqu'au segment T3 puis		
	traversent la ligne médiane		
	(Merritt et Whitington, 1995).		

Il est important de remarquer que le type de neurone sensoriel formé est indépendant du lignage dont il provient. Par exemple, les neurones multidendritiques de classe IV vmd4a et vmd1a proviennent soit d'un lignage md-es (vmd4a), soit d'un lignage md-solo (vmd1a). À l'inverse, les neurones multidendritiques vbd et ses voisins proviennent du même lignage mais sont très différents.

Tous les neurones multidendritiques accumulent spécifiquement la β -galactosidase dans la lignée enhancer-trap E7-2-36 (Bier et al., 1989). La lignée enhancer-trap E7-3-49 semble marquer tous les neurones multidendritiques qui ne dépendent pas des gènes du complexe *achaete-scute* : vpda, lbd, dbd et sa cellule gliale associée, dda1 et un neurone multidendritique du groupe dorsal non identifié (Brewster et Bodmer, 1995 ; Brewster et al., 2001).



Fig. A-2 - Les organes sensoriels de la région postérieure de la larve. (A) Schéma des organes sensoriels externes présents à la surface de la cuticule (Campos-Ortega et Hartenstein, 1997). (B) Schéma des cellules sensorielles de l'hémisegment A8 et de l'organe impair vas (observations personnelles). L'organe impair vas est décrit dans Dambly-Chaudière et Ghysen, 1986 et dans Campos-Ortega et Hartenstein, 1997. Comme les cellules pI sont situées de part et d'autre de la ligne médiane (article 3), la formation de cet organe impair reste mystérieuse. Nomenclature de Campos-Ortega et Hartenstein, 1997.



Fig. A-3 - Schéma des neurones sensoriels de la région ventrale et latérale à différents stades. (A) Stade larvaire. (B) Stade pupal. (C) Stade adulte juste avant l'éclosion. Les neurones qui se prolongent dans le SNC par le nerf intersegmentaire sont en bleus, ceux par le nerf segmentaire sont en rouge et en vert. Le neurone lbd (en noir) est le seul neurone sensoriel qui se projette dans le SNC par le nerf transverse. D'après Williams et Shepherd, 1998.

Les organes sensoriels de l'adulte

Les régions les mieux connues sont le thorax et les ailes (Fig. A-4-5). Des soies mécanosensorielles de petite taille (microchètes) ou de grande taille (macrochètes) recouvrent la totalité du corps (Fig. A-4). Sur le thorax, les microchètes forment dix rangées alignées selon l'axe antéro-postérieur de l'animal et les macrochètes occupent des positions très reproductibles d'un individu à l'autre (Fig. A-5). Des papilles mécanosensorielles ont surtout été observées sur les ailes (Fig. A-4-5). Des soies gustatives sont présentes sur la marge de l'aile, les pattes, le labelle et les autres régions de la tête (Fig. A-4-7). Elles sont toutes pourvues d'une bractée, qui est une petite structure cuticulaire produite par une cellule épidermique associée (Fig. A-7). Les soies olfactives sont présentes uniquement sur le troisième segment antennaire et le palpe maxillaire (Fig. A-6). Les organes chordotonaux de l'adulte les plus étudiés sont l'organe de Johnston présent à la base de l'antenne (organe auditif) et l'organe chordotonal du fémur (organe propriocepteur).

Références!:

Description de l'ensemble du corps de l'adulte : Hertweck, 1931 Hodgkin et Bryant, 1978 Stocker, 1994 Shanbhag et al., 1999 Stocker, 2001

Description du SNP du thorax et des ailes : Miller, 1950 Bryant, 1978 Kankel et al., 1980 Palka et al., 1979 Cole et Palka, 1982 Hartenstein et Posakony, 1989 Usui et Kimura, 1993

Description du SNP du labelle : Falk et al., 1976 Ray et al., 1993



Fig. A-4 - Schéma de la position des différents organes sensoriels chez *D. melanogaster.* Les soies mécanosensorielles sont en bleu clair (microchètes) ou bleu foncé (macrochètes). Les papilles mécanosensorielles sont en vert. Les soies gustatives et olfactives en violet. D'après Hartenstein, 1993.



Fig. A-5 - Les organes sensoriels du thorax et de l'aile. (A) Schéma de la partie droite du thorax et de l'aile droite. Les points sur le thorax représentent la position des microchètes. Les ronds sur le thorax correspondent à des macrochètes et ceux sur l'aile à des papilles. (B) Détail de la région proximale antérieure de l'aile. (C) Schéma de la position des différents organes sensoriels sur la marge antérieure de l'aile. D'après Huang et al., 1991; Palka et al., 1979 et Hartenstein et Posakony, 1989.



Fig. A-6 - Schéma de la position des organes gustatifs et olfactifs chez *D. melanogaster.* Les trajets des axones des neurones gustatifs sont en rose et ceux des neurones olfactifs sont en rouge. D'après Stocker, 1994.



Fig. A-7 - Schéma des organes sensoriels du premier segment du tarse de la patte en vue panoramique. D'après Held, 2002.

Protocoles

Fixation des embryons

déchorionnation 2-3min les embryons à l'eau de Javel 25% lavage eau du robinet fixation 20min formaldéhyde 4% + heptane dévitellinisation au méthanol 3 lavages méthanol conservation dans le méthanol à -20°C

Marquage in situ

réhydratation 2min 50% méthanol + PBT* (PBT* = PBS, O,1% Tween 20, eau DEPC) 2 lavages 2min PBT* fixation 15min formaldéhyde 4% (200µL FA+ 1600µL PBT) 1 lavage rapide PBT (PBS, O,1% Tween 20, eau monodistillée) 5 lavages 5min sur roue PBT* 5 min 50% PBT* + HYB

solution HYB : (3mL / tube)

5mL	7,5mL	10mL	formamide désionisée
2,5mL	3,75mL	5mL	SSC 20x eau DEPC
2,4mL	3,6mL	4,8mL	Tris HCl pH=6,8
100µL	150µL	200µL	Tween 10%
10µL	15µL	20µL	héparine
<u>20µL</u>	<u>30µL</u>	<u>40µL</u>	ARNt
10mL :	15mL	20mL	

5min HYB

1h HYB à 55°C

ON à 55°C avec la sonde (1 μ L dans 300 μ L), dénaturer à 80°C éventuellement lors de la première utilisation

1 lavage 20min HYB à 55°C

(préincuber l'anticorps anti-DIG-HRP au 1/500^e avec des embryons réhydratés 1h à RT)

1 lavage 20min 50% HYB + PBT à 55°C

4 lavages 20min PBT à 55°C, le dernier est mis sur roue à RT

incubation 2h anticorps anti-DIG-HRP (Roche) au $1/500^{e}$ ou anti-DIG-AP (Roche) au $1/2000^{e}$

3 lavages 10min PBT¹

¹ Pour la révélation AP :

³ lavages 20min PBT puis

³ lavages 5min tampon de coloration : (2mL / tube)

réaction HRP 10min avec TSA-FITC (NEN, 4µL dans 200µL tampon d'amplification) 1 lavage rapide PBT 3 lavages 10min PBT traitement H₂O₂ 0,3% 30 min sur roue 1 lavage rapide PBT 5 lavages 5min PBT incubation ON anticorps primaires (anti-Cut (DSHB) au 1/1000^e, anti-Bgal (Cappel) au 1/2000^e, anti-Pros (Jan) au 1/1000^e)

Marquage anticorps simple

réhydratation 50% méthanol + PBT, puis 75% méthanol + PBT 3 lavages rapides PBT 3 lavages 20min PBT incubation 1h anticorps primaires 3 lavages 20min PBT incubation 1h anticorps secondaires 3 lavages 20min PBT passage en 50% PBT + glycérol dépôt des embryons sur lame dans le milieu de montage (80% glycérol+ 2, 5% npropyl-galate)

Marquage anticorps avec amplification du signal Cut

réhydratation 50% méthanol + PBT, puis 75% méthanol + PBT 3 lavages rapides PBT 3 lavages 20min PBT incubation 1h anticorps primaires (dont anti-Cut (DSHB) au 1/1000^e) 3 lavages 20min PBT incubation 1h anticorps secondaires (dont anti-souris-biotine (Jackson) au 1/1000^e, anti-lapin-biotine (Jackson) au 1/1000^e, anti-lapin-Cy5 (Jackson) au 1/500^e) 3 lavages 20min PBT (préparer, 30 min avant, la solution streptavidine-HRP : solution A + solution B au 1/100^e dans du PBT)

200µL 300µL	NaCl 5M	
500µL	750µL MgCl2 1M	
1mL	1,5mL Tris pH=9,5	
50µL	75µL Tween 10%	
<u>8,25mL</u>	<u>12,4mL</u> eau monodistillée	
10mL	15mL	
coloration dans des co	oupelles : 400µL solution de coloration	+ 3,5μL BCIP
		+ 4,5µL NBT

laisser le même temps de coloration pour le marquage TSA-FITC

incubation 1h streptavidine-HRP (kit ABC Vectastain) 3 lavages 10 min PBT réaction HRP 10min avec TSA-biotine (NEN, 4µL dans 200µL tampon d'amplification) 1 lavage rapide PBT 3 lavages 10min PBT incubation 30min streptavidine-Alexa568 (Molecular Probes) au 1/1000^e 3 lavages 10 min PBT passage en 50% PBT + glycérol dépot des embryons sur lame dans le milieu de montage

RÉFÉRENCES

Adams, C. M., Anderson, M. G., Motto, D. G., Price, M. P., Johnson, W. A. and Welsh, M. J. (1998). Ripped pocket and pickpocket, novel Drosophila DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. *J Cell Biol* **140**, 143-52.

Adler, P. N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in Drosophila. *Dev Cell* **2**, 525-35. Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. and de Rosa, R. (2000). The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4453-6.

Aguinaldo, A. M., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A. and Lake, J. A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**, 489-493.

Alifragis, P., Poortinga, G., Parkhurst, S. M. and Delidakis, C. (1997). A network of interacting transcriptional regulators involved in Drosophila neural fate specification revealed by the yeast two-hybrid system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13099-104.

Alonso, M. C. and Cabrera, C. V. (1988). The *achaete-scute* gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO J.* **7**, 2585-2591.

Altner, H. (1977). Insect sensillum specificity and structure: An approach to a new typology. In *Olfaction and taste IV*, (ed. J. Le Magnen and P. MacLeod), pp. 295-303. Washington, DC.

Altner, H., Routil, C. and Loftus, R. (1981). The structure of bimodal chemo-, thermo-, and hygroreceptive sensilla on the antenna of *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res* **215**, 289-308.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila*. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ashraf, S. I. and Ip, Y. T. (2001). The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in Drosophila. *Development* **128**, 4757-67.

Awasaki, T. and Kimura, K. (1997). *pox-neuro* is required for development of chemosensory bristles in *Drosophila*. J. Neurobiol. **32**, 707-721.

Awasaki, T. and Kimura, K. (2001). Multiple function of poxn gene in larval PNS development and in adult appendage formation of Drosophila. *Dev Genes Evol* 211, 20-9.

Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995). Suppressor of Hairless directly activates transcription of *Enhancer of split* Complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* **9**, 2609-2622.

Balcells, L., Modolell, J. and Ruiz-Gomez, M. (1988). A unitary basis for different *Hairywing* mutations of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **7**, 3899-3906.

Barolo, S., Walker, R., Polyanovsky, A., Freschi, G., Keil, T. and Posakony, J. W. (2000). A Notch-independent activity of Suppressor of Hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**, 957-969.

Baron, M. (2003). An overview of the Notch signalling pathway. Semin Cell Dev Biol 14, 113-9.

Bate, C. M. (1976). Pioneer neurones in an insect embryo. Nature 260, 54-6.

Bate, M. (1978). Development of sensory systems in Arthropods. In *Handbook of sensory physiology*, (ed. M. Jakobson), pp. 1-53. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Bellaïche, Y., Radovic, A., Woods, D. F., Hough, C. D., Parmentier, M. L., O'Kane, C. J., Bryant, P. J. and Schweisguth, F. (2001). The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in Drosophila. *Cell* 106, 355-66.

Bellen, H. J., Kooyer, S., D'Evelyn, D. and Pearlman, J. (1992). The *Drosophila* couch potato protein is expressed in nuclei of peripheral neuronal precursors and shows homology to RNA-binding proteins. *Genes Dev.* **6**, 2125-2136.

Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M. and Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila. *Dev Cell* **3**, 221-31.

Berlese, A. (1909). Sistema periferico sensoriale. In Gli Insetti, vol. 1, pp. 601-699.

Bertrand, N., Castro, D. and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neuro.* **3**, 517-530.

Betschinger, J., Mechtler, K. and Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-30.

Bier, E., Väessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E. et al. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-*lacZ* vector. *Genes Dev.* **3**, 1273-1287.

Blochinger, K., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1991). Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of Cut in *Drosophila*. *Genes and Dev.* **5**, 1124-1135.

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

Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of Cut, a protein required for external sensory organ development, in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes and Dev.* **4**, 1322-1331.

Blochlinger, K., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1993). Postembryonic patterns of expression of *cut*, a locus regulating sensory organ identity in *Drosophila*. *Development* **117**, 441-450.

Bodmer, R., Barbel, S., Sheperd, S., Jack, J. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1987). Transformation of sensory organs by mutations of the *cut* locus of *D. melanogaster. Cell* **51**, 293-307.

Bodmer, R., Carretto, R. and Jan, Y. N. (1989). Neurogenesis of the peripheral nervous system in Drosophila embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* **3**, 21-32.

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

Bonkowsky, J. L. and Thomas, J. B. (1999). Cell-type specific modular regulation of derailed in the Drosophila nervous system. *Mech Dev* 82, 181-4.

Bopp, D., Jamet, E., Baumgartner, S., Burri, M. and Noll, M. (1989). Isolation of two tissue-specific Drosophila paired box genes, Pox meso and Pox neuro. *Embo J* 8, 3447-57.

Bork, P. and Margolis, B. (1995). A phosphotyrosine interaction domain. Cell 80, 693-4.

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-18.

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

Brewster, R. and Bodmer, R. (1995). Origin and specification of type II sensory neurons in *Drosophila. Development* **121**, 2923-2936.

Brewster, R., Hardiman, K., Deo, M., Khan, S. and Bodmer, R. (2001). The selector gene cut represses a neural cell fate that is specified independently of the Achaete-Scute-Complex and atonal. *Mech Dev* **105**, 57-68.

Brody, T. and Odenwald, W. F. (2002). Cellular diversity in the developing nervous system: a temporal view from Drosophila. *Development* **129**, 3763-70.

Brou, C., Logeat, F., Lecourtois, M., Vandekerckhove, J., Kourilsky, P., Schweisguth, F. and Israel, A. (1994). Inhibition of the DNA-binding activity of *Drosophila* Suppressor of

Hairless and of its human homolog, KBF2/RBP-J κ , by direct protein-protein interaction with *Drosophila* Hairless. *Genes Dev.* **8**, 2491-2503.

Bryant, P. J. (1978). Pattern Formation in Imaginal Discs. In *The Genetics and Biology of Drosophila.*, vol. 2c (ed. M. Ashburner and T. R. F. Wright), pp. 230-336. London: Academic Press, Inc.

Cabrera, C. V. and Alonso, M. C. (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila*. *EMBO J.* **10**, 2965-2973.

Cabrera, C. V., Martinez-Arias, A. and Bate, M. (1987). The expression of three members of the *achaete-scute* gene complex correlates with neuroblast segregation in Drosophila. *Cell* **50**, 425-433.

Cagan, R. L. and Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Devel. Biol.* 136, 346-362.

Cai, Y., Chia, W. and Yang, X. (2001). A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate Drosophila neuroblast asymmetric divisions. *Embo J* 20, 1704-14.

Caldwell, J. C. and Eberl, D. F. (2002). Towards a molecular understanding of Drosophila hearing. *J Neurobiol* 53, 172-89.

Calleja, M., Renaud, O., Usui, K., Pistillo, D., Morata, G. and Simpson, P. (2002). How to pattern an epithelium: lessons from achaete-scute regulation on the notum of Drosophila. *Gene* **292**, 1-12.

Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C. Q. and Tomlinson, A. (1994). RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in Drosophila. *Development* **120**, 2957-66.

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

Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1997). The embryonnic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin/Heidelberg/New-York/Tokyo.: Springer-Verlag.

Campuzano, S., Balcells, L., Villares, R., Carramolino, L., Garcia-Alonso, L. and Modolell, J. (1986). Excess function *Hairy-wing* mutations caused by *gypsy* and *copia* insertions within structural genes of the *achaete-scute* locus of *Drosophila*. *Cell* 44, 303-312.

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

Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F. and Chia, W. (1998). Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis. *Genes Dev* **12**, 304-15.

Carroll, S. B., Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. (2001). From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design: Blackwell Science Inc.

Caudy, M., Grell, E. H., C., D.-C., Ghysen, A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1988a). The maternal sex determination gene *daughterless* has zygotic activity necessary for the formation of peripheral neurons in *Drosophila*. *Genes Dev.* **2**, 843-52.

Caudy, M., Vässin, H., Brand, M., Tuma, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1988b). *daughterless*, a Drosophila gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to *myc* and the *achaete-scute* complex. *Cell* **55**, 1061-1067.

Cayouette, M. and Raff, M. (2002). Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from Drosophila to mammals. *Nat Neurosci* **5**, 1265-9.

Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G. and Raff, M. (2001). Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci* 21, 5643-51.

Chien, C. T., Hsiao, C. D., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996). Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13239-13244.

Choi, K. W. and Benzer, S. (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing Drosophila eye. *Neuron* 12, 423-31.

Chu-Wang, I. W. and Axtell, R. C. (1972a). Fine structure of the terminal organ of the house fly larva, Musca domestica L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **127**, 287-305.

Chu-Wang, I. W. and Axtell, R. C. (1972b). Fine structure of the ventral organ of the house fly larva, Musca domestica L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **130**, 489-95.

Clever, U. (1958). Untersuchungen zur Zelldifferenzierung und Musterbildung der Sinnesorgane und des Nervensystems im Wachsmottenflügel. Z. Morph. Ökol Tiere 47, 201-248.

Clever, U. (1960). Der Einfluß der Sinneszellen auf die Borstenentwicklung bei Galleria mellonela. Wilhelm Roux's Arch. Entw. Mech. Org. 152, 137-159.

Cole, E. S. and Palka, J. (1982). The pattern of campaniform sensilla on the wing and haltere of Drosophila melanogaster and several of its homeotic mutants. *J Embryol Exp Morphol* **71**, 41-61.

Copenhaver, P. F. and Taghert, P. H. (1989). Development of the enteric nervous system in the moth. I Diversity of cell types and the embryonic expression of FMRFamide-related neuropeptides. *Devel. Biology* **131**, 70-84.

Copenhaver, P. F. and Taghert, P. H. (1990). Neurogenesis in the insect enteric nervous system : generation of premigratory from an epithelial placode. *Development* **109**, 17-28.

Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Ramain, P., Gelbart, W., Simpson, P. and Haenlin, M. (1997). u-shaped encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes achaete and scute during the formation of bristles in Drosophila. *Genes and Development* **11**, 3083-95.

Cubas, P., de Celis, J.-F., Campuzano, S. and Modolell, J. (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Dev.* **5**, 996-1008.

Cubas, P. and Modolell, J. (1992). The *extramacrochaetae* gene provides information for sensory organ patterning. *EMBO J.* 11, 3385-3393.

Culi, J. and Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev.* 122036-2047.

Dale, K. J. and Pourquie, O. (2000). A clock-work somite. *Bioessays* 22, 72-83.

Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1986). The sense organs in the *Drosophila* larva and their relation to embryonic pattern of sensory neurons. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **195**, 222-228.

Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1987). Independent subpatterns of sense organs require independent genes of the *achaete-scute* complex in *Drosophila* larvae. *Genes & Development* **1**, 297-306.

Dambly-Chaudiere, C., Jamet, E., Burri, M., Bopp, D., Basler, K., Hafen, E., Dumont, N., Spielmann, P., Ghysen, A. and Noll, M. (1992). The paired box gene pox neuro: a determinant of poly-innervated sense organs in Drosophila. *Cell* **69**, 159-72.

de Celis, J. F., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S. (1996). Functional relationships between *Notch*, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of *Notch* activities during imaginal development. *Development* 122, 2719-2728.

Deblandre, G., Lai, E. C. and Kintner, C. (2001). *Xenopus* Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with X-Delta1 and regulates Notch signaling. *Dev. Cell* **1**, 795-806.

Denell, R. E. and Frederick, R. D. (1983). Homoeosis in Drosophila: a description of the Polycomb lethal syndrome. *Dev Biol* **97**, 34-47.

Desai, C. J., Popova, E. and Zinn, K. (1994). A Drosophila receptor tyrosine phosphatase expressed in the embryonic CNS and larval optic lobes is a member of the set of proteins bearing the "HRP" carbohydrate epitope. *J Neurosci* **14**, 7272-83.

DeSalle, R. (1991). Morphological and molecular systematics of the Drosophilidae. *Ann Rev Ecol Syst* **22**, 447-75.

Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. and Scott, M. P. (1991). The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* **65**, 451-464.

Doe, C. Q. and Goodman, C. S. (1985). Neurogenesis in grasshopper and fushi tarazu Drosophila embryos. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 891-903.

Dominguez, M. and Campuzano, S. (1993). *asense*, a member of the *Drosophila achaetescute* complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* **12**, 2049-2060.

Dubruille, R., Laurencon, A., Vandaele, C., Shishido, E., Coulon-Bublex, M., Swoboda, P., Couble, P., Kernan, M. and Durand, B. (2002). Drosophila regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development* **129**, 5487-98.

Dubrulle, J. and Pourquie, O. (2002). From head to tail: links between the segmentation clock and antero-posterior patterning of the embryo. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 519-23.

Ellis, H. M., Spann, D. R. and Posakony, J. W. (1990). *extramacrochaetae*, a negative regulator of sensory organ development in Drosophila, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* **61**, 27-38.

Fabini, G., Freilinger, A., Altmann, F. and Wilson, I. B. (2001). Identification of core alpha 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from Drosophila melanogaster. Potential basis of the neural anti-horseadish peroxidase epitope. *J Biol Chem* **276**, 28058-67.

Falk, R., Bleiser-Avivi, N. and Atidia, J. (1976). Labellar taste organs of *Drosophila* melanogaster. J Morph 150, 327-341.

Fanara, J. J., Fontdevilla, A. and Hasson, E. (1999). Oviposition preference and life history traits in cactophilic *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association with their natural hosts. *Evol Ecol* **13**, 173-190.

Fehon, R. G., Johansen, K., Rebay, I. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of Notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for Notch function. *J. Cell Biol.* **113**, 657-669.

Fichelson, P. and Gho, M. (2003). The glial cell undergoes apoptosis in the microchaete lineage of Drosophila. *Development* 130, 123-33.

Franzl, W. (1941). Die Cytogenese der bipolaren Sinneszellen bei der Larve von Dytiscus sp. *Z. Zellforsch.* **31**, 54-59.

Furukawa, T., Kobayakawa, Y., Tamura, K., Kimura, K., Kawaichi, M., Tanimura, T. and Honjo, T. (1995). Suppressor of Hairless, the *Drosophila* homologue of RBP-J κ , transactivates the neurogenic gene *E(spl)m8. Jpn. J. Genet.* **70**, 505-524.

Galant, R., Skeath, J. B., Paddock, S., Lewis, D. L. and Carroll, S. B. (1998). Expression pattern of a butterfly achaete-scute homolog reveals the homology of butterfly wing scales and insect sensory bristles. *Curr Biol* **8**, 807-13.

Garcia-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *CIBA Foundation Symp.* 29, 161-182.

García-Bellido, A. (1979). Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila* melanogaster. Genetics 91, 491-520.

García-Bellido, A. and Santamaria, P. (1978). Developmental analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **88**, 469-486.

Garrell, J. and Modolell, J. (1990). The Drosophila *extramacrochaetae* locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* **61**, 39-48.

Gho, M., Bellaïche, Y. and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573-3584.

Gho, M. and Schweisguth, F. (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **393**, 178-181.

Ghysen, A. and Dambly, C. C. (1989). Genesis of the Drosophila peripheral nervous system. *Trends Genet* **5**, 251-5.

Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1988). From DNA to form: the *achaete-scute* complex. *Genes Dev.* 2, 495-501.

Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1993). The specification of sensory neuron identity in Drosophila. *Bioessays* 15, 293-8.

Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., Aceves, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1986). Sensory neurons and peripheral pathways in *Drosophila* embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 281-289.

Ghysen, A. and O'Kane, C. (1989). Neural enhancer-like elements as specific cell markers in *Drosophila*. *Development* **105**, 35-52.

Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K. A. and Delidakis, C. (2003). Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* **130**, 259-70.

Giansanti, M. G., Gatti, M. and Bonaccorsi, S. (2001). The role of centrosomes and astral microtubules during asymmetric division of Drosophila neuroblasts. *Development* **128**, 1137-45.

Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A. (1997). Functional dissection of the *Drosophila Enhancer of split* protein, a suppressor of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6250-6254.

Gnatzy, W. and Tautz, J. (1977). Sensitivity of an insect mechanoreceptor during moulting. *Physiol Entom* **2**, 279-288.

Goldstein, B. (2000). When cells tell their neighbors which direction to divide. *Dev Dyn* **218**, 23-9.

Gonzalez, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J. and Campuzano, S. (1989). Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J.* **8**, 3553-3562.

Gonzalez-Gaitan, M. and Jackle, H. (1995). Invagination centers within the Drosophila stomatogastric nervous system anlage are positioned by Notch-mediated signaling which is spatially controlled through wingless. *Development* **121**, 2313-25.

Gonzalez-Gaitan, M. and Jackle, H. (2000). Tip cell-derived RTK signaling initiates cell movements in the Drosophila stomatogastric nervous system anlage. *EMBO Rep* **1**, 366-71.

Goriely, A., Dumont, N., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1991). The determination of sense organs in *Drosophila*: effect of the neurogenic mutations in the embryo. *Development* **113**, 1395-1404.

Gould, A. P., Elstob, P. R. and Brodu, V. (2001). Insect oenocytes: a model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *J Anat* **199**, 25-33.

Goulding, S., zur Lage, P. and Jarman, A. P. (2000). *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by *lozenge*. *Neuron* 25, 69-78.

Green, P. and Hartenstein, V. (1997). Structure and spatial pattern of the sensilla of the body segments of insect larvae. *Microscopy Research and Technique* **39**, 470-8.

Grens, A., Mason, E., Marsh, J. L. and Bode, H. R. (1995). Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the Hydra achaete-scute homolog has proneural activity in Drosophila. *Development* **121**, 4027-35.

Grimaldi, D. and Nguyen, T. (1999). Monograph on the spittlebug flies, genus *Cladochaete* (Diptera: Drosophilidae: Cladochaetini). *Bull Am Mus Nat Hist* 241, 1-326.

Grueber, W. B., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2002). Tiling of the Drosophila epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* **129**, 2867-78.

Grueber, W. B., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2003). Different levels of the homeodomain protein cut regulate distinct dendrite branching patterns of Drosophila multidendritic neurons. *Cell* **112**, 805-18.

Grueber, W. B. and Truman, J. W. (1999). Development and organization of a nitric-oxidesensitive peripheral neural plexus in larvae of the moth, Manduca sexta. *J Comp Neurol* **404**, 127-41.

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

Gupta, B. P. and Rodrigues, V. (1997). *atonal* is a proneural gene for a subset of olfactory sense organs in *Drosophila*. *Genes Cells* 2, 225-233.

Gurganus, M. C., Nuzhdin, S. V., Leips, J. W. and Mackay, T. F. (1999). High-resolution mapping of quantitative trait loci for sternopleural bristle number in Drosophila melanogaster. *Genetics* **152**, 1585-604.

Haase, A., Stern, M., Wachtler, K. and Bicker, G. (2001). A tissue-specific marker of Ecdysozoa. *Dev Genes Evol* 211, 428-33.

Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P. and Ramain, P. (1997). Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of Drosophila. *Genes Dev* 11, 3096-108.

Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. and Technau, G. M. (1995). The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of Drosophila melanogaster. *Development* **121**, 317-32.

Hartenstein, V. (1988). Development of *Drosophila* larval sensory organs : spatiotemporal pattern of sensory neurones, peripheral axonal pathways and sensilla differentiation. *Development* **102**, 869-886.

Hartenstein, V. (1997). Development of the insect stomatogastric nervous system. *Trends in Neurosciences* 20, 421-7.

Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J. A. (1986). The peripheral nervous system of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 210-221.

Hartenstein, V., Hartenstein, A. Y. and Levken, A. (1994). Delamination and division in the *Drosophila* neurectoderm: spatiotemporal pattern, cytoskeletal dynamics, and common control by neurogenic and segment polarity genes. *Dev. Biol.* 165.

Hartenstein, V. and Jan, Y. N. (1992). Studying *Drosophila* embryogenesis with P-*lacZ* enhancer trap lines. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 194-220.

Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389-405.

Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1990). A dual function of the *Notch* gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev. Biol.* 142, 13-30.

Hartenstein, V., Tepass, U. and Gruszynski-deFeo, E. (1996). Proneural and neurogenic genes control specification and Morphogenesis of stomatogastric nerve cell precursors in Drosophila. *Developmental Biology* **173**, 213-27.

Hassan, B. A. and Bellen, H. J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev* 14, 1852-65.

Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* **122**, 161-171.

Heitzler, P. and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. *Cell* 64, 1083-1092.

Held Jr., L. I. (1990). Arrangement of bristles as a function of bristle number on a leg segment in *Drosophila melanosgaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **199**, 48-62.

Held, L. I., Jr. (2002). Bristles induce bracts via the EGFR pathway on Drosophila legs. *Mech Dev* 117, 225-34.

Henke, K. and Rönsch, G. (1951). Über Bildungsgleichheiten in der Entwicklung epidermaler Organe und die Entstehung des Nervensystems im Flügel der Insekten. *Naturwissenchaften* 14, 335-336.

Hertweck, H. (1931). Anatomie und Variabilität des nervensystems und der Sinnesorgane von Drosophila melanogaster (Meigen). Z. wiss. Zool. 139, 559-663.

Higashijima, S., Michiue, T., Emori, Y. and Saigo, K. (1992). Subtype determination of *Drosophila* embryonic external sensory organs by redundant homeo box genes *BarH1* and *BarH2*. *Genes Dev.* **6**, 1005-1018.

Hilton, W. (1902). The body sense hairs of lepidopterous larvae. Am. Nat. 36, 561-578.

Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A. (1994). The basic-helix-loop-helix domain of Drosophila lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77-87.

Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during Drosophila development. *Nature* **377**, 627-30.

Hoch, M., Broadie, K., Jackle, H. and Skaer, H. (1994). Sequential fates in a single cell are established by the neurogenic cascade in the Malpighian tubules of Drosophila. *Development* **120**, 3439-50.

Hoch, M. and Jackle, H. (1998). Kruppel acts as a developmental switch gene that mediates Notch signalling-dependent tip cell differentiation in the excretory organs of Drosophila. *Embo J* **17**, 5766-75.

Hodgkin, N. M. and Bryant, P. J. (1978). Scanning electron microscopy of the adult of *Drosophila melanogaster*. In *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 2c (ed. M. Ashburner and T. R. F. Wright), pp. 337-358. New-York: Academic Press.

Huang, F., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **111**, 1087-1095.

Huang, M.-H., Hsu, C.-H. and Chien, C.-T. (2000). The proneural gene *amos* promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron* **25**, 57-67.

Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J. B., Nabeshima, Y., Doe, C. Q. and Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during Drosophila asymmetric divisions. *Nature* **390**, 625-9.

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C. Q. (2001). Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**, 511-21.

Jack, J., Dorsett, D., Delotto, Y. and Liu, S. (1991). Expression of the *cut* locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer. *Development* **113**, 735-747.

Jägers-Röhr, E. (1968). Untersuchungen zur Morphologie und Entwicklunge der Scolopidialorgane bei der Stabheuschrecke *Carausius morosus. Br. Biol. Zbl.* 87, 393-409.

Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 2700-2704.

Jan, Y. N., Ghysen, A., Cristoph, I., Barbel, S. and Jan, L. Y. (1985). Formation of neuronal pathways in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. J. Neurosci. 5, 2453-2464.

Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1995). Maggot's hair and bug's eye: role of cell interactions and intrinsic factors in cell fate specification. *Neuron* 14, 1-5.

Jarman, A., Grell, E., Ackerman, L., Jan, L. and Jan, Y. (1994). *atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**, 398-400.

Jarman, A. P. and Ahmed, I. (1998). The specificity of proneural genes in determining *Drosophila* sense organ identity. *Mech. Dev.* 76, 117-125.

Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1993). *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell* **73**, 1307-1321.

Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1995). Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121, 2019-2030.

Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S. (1994). The Notch signalling pathway is required for *Enhancer of split* bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 3537-3548.

Jhaveri, D., Sen, A., Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (2000). Sense organ identity in the Drosophila antenna is specified by the expression of the proneural gene atonal. *Mech Dev* 99, 101-11.

Jimenez, F. and Campos-Ortega, J. (1990). Defective neuroblast commitment in mutants of the *achaete-scute* complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron* **5**, 81-89.

Jimenez, F. and Campos-Ortega, J. A. (1979). A region of the Drosophila genome necessary for CNS development. *Nature* 282, 310-312.

Jimenez, G. and Ish-Horowicz, D. (1997). A chimeric Enhancer-of-split transcriptional activator drives neural development and *achaete-scute* expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4355-4362.

Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. and Goodman, C. S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82, 1013-23.

Jürgens, G. (1987). Segmental organisation of the tail region in the embryo of *Drosophila* melanogaster. Roux's Arch Dev Biol **196**, 141-157.

Jürgens, G., Lehmann, R., Schardin, M. and Nüsslein-Volhard, C. (1986). Segmental organisation of the head in the embryo of *Drosophila melanogaster*. A blastoderm fate map of the cuticule structures of the larval head. *Roux's Arch Dev Biol* **195**, 359-377.

Justice, N., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2003). Lethal giant larvae acts together with numb in notch inhibition and cell fate specification in the Drosophila adult sensory organ precursor lineage. *Curr Biol* **13**, 778-83.

Kageyama, R. and Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 7, 659-65.

Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H. and Brand, A. H. (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol* **2**, 7-12.

Kania, A., Han, P. L., Kim, Y. T. and Bellen, H. (1993). Neuromusculin, a Drosophila gene expressed in peripheral neuronal precursors and muscles, encodes a cell adhesion molecule. *Neuron* **11**, 673-87.

Kankel, D. R., Ferrus, A., Garen, S. H., Harte, P. J. and Lewis, P. (1980). The structure and development of the nervous system. In *The Genetics and biology of Drosophila*, vol. 2d (ed. M. Ashburner and T. R. F. Wright), pp. 295-368. London: Academic Press.

Keil, T. A. (1997). Comparative morphogenesis of sensilla: A review. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 26, 151-160.

Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**, 624-627.

Knust, E., Schrons, H., Grawe, F. and Campos-Ortega, J. A. (1992). Seven genes of the *Enhancer of split* complex of *Drosophila melanogaster* encode helix-loop-helix proteins. *Genetics* **132**, 505-518.

Köhler, W. (1931). Die Entwicklung des Flügel bei der Mehlmotte Ephestia Kühniella Zeller, mit besonderer Berücksichtigung des Zeichnungsmusters. Z. Morph. Ökol. Tiere 24, 582-681.

Kooh, P. J., Fehon, R. G. and Muskavitch, M. A. (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* **117**, 493-507.

Kopp, A., Duncan, I., Godt, D. and Carroll, S. B. (2000). Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in Drosophila. *Nature* **408**, 553-9.

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

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

Krumins, R. (1952). Die Bortenentwicklung bei der Wachsmotte *Galleria mellonella* L. *Biol. Zbl.* **71**.

Kuchinke, U., Grawe, F. and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in Drosophila by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol* **8**, 1357-65.

Kuhn, D. T., Sawyer, M., Packert, G., Turenchalk, G., Mack, J. A., Sprey, T. E., Gustavson, E. and Kornberg, T. B. (1992). Development of the D. melanogaster caudal segments involves suppression of the ventral regions of A8, A9 and A10. *Development* **116**, 11-20.

Kunisch, M., Haenlin, M. and Campos-Ortega, J. A. (1994). Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* is enhanced by proneural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10139-10143.

Lachaise, D. and Tsacas, L. (1983). breeding sites in tropical african Drosophilids. In *The* genetics and Biology of Drosophila, vol. III (ed. M. Ashburner H. L. Carson and J. N. Thompson), pp. 221-332. London: Academic Press.

Lai, E. C. (2003). Drosophila Tufted Is a Gain-of-Function Allele of the Proneural Gene amos. *Genetics* 163, 1413-25.

Lai, E. C., Deblandre, G., Kintner, C. and Rubin, G. M. (2001). *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev. Cell* **1**, 783-794.

Lawrence, P. A. (1966). Development and determination of hairs and bristles in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus. J. Cell Sci.* 1, 475-498.

Le Borgne, R. and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* sous presse.

Le Borgne, R., Bellaiche, Y. and Schweisguth, F. (2002). Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* **12**, 95-104.

Lecourtois, M. and Schweisguth, F. (1995). The neurogenic Suppressor of Hairless DNAbinding protein mediates the transcriptional activation of the *Enhancer of split* Complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev.* **9**, 2598-2608. Ledent, V. and Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res* **11**, 754-70.

Lees, A. D. and Waddington, C. H. (1942). The development of the bristles in normal and some mutant types of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Soc. Ser. B* 131, 87-110.

Lehmann, R., Jiménez, F., Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **192**, 62-74.

Leyns, L., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1989). Two different sets of cis elements regulate scute to establish two different sensory patterns. *Roux's Arch Dev Biol* **198**, 227-232.

Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y. and Chia, W. (1997). Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during Drosophila neuroblast cell divisions. *Cell* **90**, 437-47.

Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V. and Young, M. W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* **7**, 1949-1965.

Lipp, C. (1957). Die Bedeutuung differentieller Zellteilungen bei der Entstehung des Schuppenmusters auf dem Flügel von Pieris brassicae. *Biol. Zbl.* **76**, 681-700.

Liu, L., Yermolaieva, O., Johnson, W. A., Abboud, F. M. and Welsh, M. J. (2003). Identification and function of thermosensory neurons in Drosophila larvae. *Nat Neurosci* 6, 267-73.

Lohs-Schardin, M., Cremer, C. and Nüsslein-Volhard. (1979). A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster* : localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam. *Developmental Biology* **73**, 239-255.

Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature* **409**, 522-5.

Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1998). Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetrical localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* **95**, 225-235.

Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L. and Jan, Y. N. (1999). Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in Drosophila. *Current Biology* **9**, 1247-50.

Ludlow, C., Choy, R. and Blochlinger, K. (1996). Functional analysis of Drosophila and mammalian cut proteins in files. *Dev Biol* 178, 149-59.

Lyman, R. F., Lai, C. and MacKay, T. F. (1999). Linkage disequilibrium mapping of molecular polymorphisms at the scabrous locus associated with naturally occurring variation in bristle number in Drosophila melanogaster. *Genet Res* **74**, 303-11.

Mann, R. S. and Carroll, S. B. (2002). Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12, 592-600.

Manning, L. and Doe, C. Q. (1999). Prospero distinguishes sibling cell fate without asymmetric localization in the *Drosophila* adult external sense organ lineage. *Development* 126, 2063-2071.

Martin-Bermudo, M. D., Martinez, C., Rodriguez, A. and Jimenez, F. (1991). Distribution and function of the *lethal of scute* gene product during early neurogenesis in *Drosophila. Development* **113**, 445-454.

Martin-Bermundo, M. D., Carmena, A. and Jimenez, F. (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* **121**, 219-224.

Martinez, C. and Modolell, J. (1991). Cross-regulatory interactions between the proneural *achaete* and *scute* genes of *Drosophila*. *Science* **251**, 1485-1487.

Martini, R. and Schmidt, K. (1983). Cell degeneration during early development of hymenopteran olfactory sensilla. *Tissue Cell* 15, 823-7.

Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H. and Izumi, H. (1998). miranda localizes staufen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis. *Development* **125**, 4089-98.

Matthews, K. A., Miller, D. F. and Kaufman, T. C. (1990). Functional implications of the unusual spatial distribution of a minor alpha-tubulin isotype in Drosophila: a common thread among chordotonal ligaments, developing muscle, and testis cyst cells. *Dev Biol* **137**, 171-83. Mayer. (1896). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv.* **29**, 207-236.

Mayer, U. and Nusslein, V. C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the Drosophila embryo. *Genes Dev* 2, 1496-511.

McAlpine, J. F. (1989). Phylogeny and classification of the Muscomorpha. In *Manual of Nearctic Diptera*, (ed. J. F. McAlpine and D. M. Wood), pp. 1397-1518.: Research Branch, Agriculture Canada, Monograph.

Mehta, B. and Bhat, K. M. (2001). Slit signaling promotes the terminal asymmetric division of neural precursor cells in the Drosophila CNS. *Development* **128**, 3161-8.

Meier, T., Chabaud, F. and Reichert, H. (1991). Homologous patterns in the embryonic development of the peripheral nervous system in the grasshopper Schistocerca gregaria and the fly Drosophila melanogaster. *Development* **112**, 241-53.

Merritt, D. J. (1997). Transformation of external sensilla to chordotonal sensilla in the cut mutant of Drosophila assessed by single-cell marking in the embryo and larva. *Microscopy Research and Technique* **39**, 492-505.

Merritt, D. J., Hawken, A. and Whitington, P. M. (1993). The role of the cut gene in the specification of central projections by sensory axons in Drosophila. *Neuron* **10**, 741-52.

Merritt, D. J. and Whitington, P. M. (1995). Central projections of sensory neurons in the Drosophila embryo correlate with sensory modality, soma position, and proneural gene function. *J Neurosci* **15**, 1755-67.

Miller, A. (1950). The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila* melanogaster. In Biology of Drosophila, (ed. M. Demerec), pp. 420-534. New-York: J. Wiley and Sons.

Moore, A. W., Barbel, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2000). A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10436-41.

Moore, A. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2002). hamlet, a binary genetic switch between single- and multiple- dendrite neuron morphology. *Science* **297**, 1355-8.

Muller, H. A. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from Drosophila. *Dev Dyn* **218**, 52-67.

Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

Muskavitch, M. A. (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* **166**, 415-30.

Nagel, A. C., Maier, D. and Preiss, A. (2000). Su(H)-independent activity of hairless during mechano-sensory organ formation in Drosophila. *Mech Dev* **94**, 3-12.

Nakao, K. and Campos-Ortega, J. A. (1996). Persistent expression of genes of the *Enhancer of split* complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron* 16, 275-286.

Newton, H. C. F. (1931). On the so-called 'Olfactory Pores' in the Honey-bee. *Quart. J. Micr. Sci.* 74, 647-668.

Nolo, R., Abbott, L. and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**, 349-362.

Noordermeer, J. N., Kopczynski, C. C., Fetter, R. D., Bland, K. S., Chen, W. Y. and Goodman, C. S. (1998). Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in Drosophila. *Neuron* 21, 991-1001.

Nottebohm, E., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1992). Connectivity of chemosensory neurons is controlled by the gene poxn in Drosophila. *Nature* **359**, 829-32.

Nottebohm, E., Usui, A., Therianos, S., Kimura, K., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1994). The gene poxn controls different steps of the formation of chemosensory organs in Drosophila. *Neuron* **12**, 25-34.

Nüesch, H. (1952). Über den Einsfluss der nerven auf die Muskelentwicklung bei *Telea* polyphenus (Lepid.). *Rev. Suisse Zool.* **59**, 294-301.

O'Kane, C. J. and Gehring, W. J. (1987). Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9123-9127.

Oellers, N., Dehio, M. and Knust, E. (1994). bHLH proteins encoded by the *Enhancer of split* complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 465-473.

Ohshiro, T., Yagami, T., Zhang, C. and Matsuzaki, F. (2000). Role of cortical tumoursuppressor proteins in asymmetric division of Drosophila neuroblast. *Nature* **408**, 593-6.

Okabe, M. and Okano, H. (1997). Two-step induction of chordotonal organ precursors in Drosophila embryogenesis. *Development* **124**, 1045-53.

Olson, M. R., Holley, C. L., Yoo, S. J., Huh, J. R., Hay, B. A. and Kornbluth, S. (2003). Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* 278, 4028-34.

Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaiche, Y. (2002). Binary cell death decision regulated by unequal partitioning of Numb at mitosis. *Development* **129**, 4677-84.

Orgogozo, V., Schweisguth, F. and Bellaïche, Y. (2001). Lineage, cell polarity and inscuteable function in the peripheral nervous system of the Drosophila embryo. *Development* **128**, 631-43.

Osborne, M. P. (1963). The sensory neurones and sensilla in the abdomen and thorax of the blowfly larva. *Quart. J. Micr. Sci.* **104**, 227-241.

Palka, J., Lawrence, P. A. and Hart, H. S. (1979). Neural projection patterns from homeotic tissue of *Drosophila* studied in bithorax mutants and mosaics. *Dev Biol* **69**, 549-575.

Parks, A. L. and Muskavitch, M. A. (1993). *Delta* function is required for bristle organ determination and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **157**, 484-496.

Parras, C., Garcia-Alonso, L. A., Rodriguez, I. and Jimenez, F. (1996). Control of neural precursor specification by proneural proteins in the CNS of Drosophila. *Embo J* **15**, 6394-9.

Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K., Muskavitch, M. A. T., Moschonas, N. and Delidakis, C. (2001). *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev. Cell* **1**, 807-816.

Peng, C. Y., Manning, L., Albertson, R. and Doe, C. Q. (2000). The tumour-suppressor genes lgl and dlg regulate basal protein targeting in Drosophila neuroblasts. *Nature* **408**, 596-600.

Perry, M. M. (1968). Further studies on the development of the of Drosophila melanogaster. II. The interommatidial bristles. *J Morphol* **124**, 249-62.

Peters, W. (1963). Die Sinnesorgane an des Labellen von *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera). **55**, 259-320.

Peyrefitte, S., Kahn, D. and Haenlin, M. (2001). New members of the Drosophila Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix-loophelix genes. *Mech Dev* **104**, 99-104.
Pickup, A., Lamka, M., Sun, Q., Yip, M. and Lipshitz, H. (2002). Control of photoreceptor cell morphology, planar polarity and epithelial integrity during *Drosophila* eye development. *Development* **129**, 2247-2258.

Pistillo, D., Skaer, N. and Simpson, P. (2002). scute expression in Calliphora vicina reveals an ancestral pattern of longitudinal stripes on the thorax of higher Diptera. *Development* **129**, 563-72.

Portman, D. S. and Emmons, S. W. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factors LIN-32 and HLH-2 function together in multiple steps of a C. elegans neuronal sublineage. *Development* **127**, 5415-26.

Rangarajan, R., Gong, Q. and Gaul, U. (1999). Migration and function of glia in the developing Drosophila eye. *Development* **126**, 3285-92.

Rath, P., Lin, S., Udolph, G., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W. (2002). Inscuteableindependent apicobasally oriented asymmetric divisions in the Drosophila embryonic CNS. *EMBO Rep* **3**, 660-5.

Ray, K., Hartenstein, V. and Rodrigues, V. (1993). Development of the taste bristles on the labellum of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* 155, 26-37.

Rebay, I., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* **74**, 319-329.

Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (1999a). A glial cell arises from an additional division within the mechanosensory lineage during development of the microchaete on the *Drosophila* notum. *Development* **126**, 4617-4622.

Reddy, G. V. and Rodrigues, V. (1999b). Sibling cell fate in the Drosophila adult external sense organ lineage is specified by prospero function, which is regulated by Numb and Notch. *Development* **126**, 2083-92.

Remsen, J. and O'Grady, P. (2002). Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. *Mol Phylogenet Evol* **24**, 249-64. **Renaud, O. and Simpson, P.** (2002). Movement of bristle precursors contributes to the spacing pattern in Drosophila. *Mech Dev* **119**, 201-11.

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

Richter, A. (1962). Über die Entwicklung der Schuppenorgane und der Genitalanhänge in Abhängigkeit vom Hormonsystem bei *Lepisma saccharina* L. *Roux's Arch. für EntwMech.* **154**, 1-28.

Robinow, S. and White, K. (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during Drosophila melanogaster development. *J Neurobiol* **22**, 443-61.

Rodriguez, I., Hernandez, R., Modolell, J. and Ruiz-Gomez, M. (1990). Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *EMBO J.* 9, 3583-3592.

Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001a). Bazooka is required for localization of determinants and controlling proliferation in the sensory organ precursor cell lineage in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14469-74.

Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001b). Two types of asymmetric divisions in the Drosophila sensory organ precursor cell lineage. *Nature Cell Biology* **3**, 58-67.

Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. R. and Modolell, J. (1989). Expression of *achaete* and *scute* genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev.* **3**, 997-1007.

Romani, S., Campuzano, S. and Modolell, J. (1987). The *achaete-scute* complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 6, 2085-2092.

Rönsch, G. (1954). Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen zur Zelldifferenzierung am Flügel der Trichoptere *Limnophilus flavicornis*. *Fabr. Z. Morph. Ökol. Tiere* **43**, 1-62.

Ruiz Gomez, M. and Bate, M. (1997). Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb. *Development* 124, 4857-66.

Ruiz-Gomez, M. and Ghysen, A. (1993). The expression and role of a proneural gene, *achaete*, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* **12**, 1121-1130.

Ruiz-Gómez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jäckle, H. and Bate, M. (1997). Specific muscle identities are regulated by Krüppel during Drosophila embryogenesis. *Development* **124**, 3407-14.

Rutledge, B. J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y. N. and Perrimon, N. (1992). The Drosophila spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev* **6**, 1503-17.

Salazar-Ciudad, I., Jernvall, J. and Newman, S. A. (2003). Mechanisms of pattern formation in development and evolution. *Development* 130, 2027-37.

Sanchez. (1919a). L. Trab. Invest. Biol. 17, 1-63.

Sanchez. (1919b). L. Trab. Invest. Biol. 17, 117-180.

Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C. and Di Fiore, P. P. (2000). Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* **151**, 1345-52.

Sato, T. and Denell, R. E. (1986). Segmental identity of caudal cuticular features of *Drosophila melanogaster* larvae and its control by the bithorax complex. *Dev Biol* 116, 78-91. Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M. and Knoblich, J. A. (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the Drosophila nervous system. *Cell* 107, 183-94.

Schaefer, M., Shevchenko, A. and Knoblich, J. A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila [see comments]. *Current Biology* **10**, 353-62.

Schäffer. (1889). Zool. Jb. Abt. Anat. Ontog. Tiere 3, 611-652.

Schmidt, M. and Gnatzy, W. (1984). Are the funnel-canal organs the 'campaniform sensilla' of the shore crab, Carcinus maenas (Decapoda, Crustacea)? II. Ultrastructure. *Cell Tissue Res* 237, 81-93.

Schober, M., Schaefer, M. and Knoblich, J. A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in Drosophila neuroblasts. *Nature* **402**, 548-51.

Schuckman, v. (1909). Über die Entwirkung niederer Temperaturen auf den Fortgang der inneren Metamorphose bei der Puppe von *Vanessa urticae*. Arch Entw mechan 27.

Schuckmann, v. (1909). Wilhelm Roux's Arch. Entw. Mech. Org. 27, 519-559.

Schuldt, A. J., Adams, J. H., Davidson, C. M., Micklem, D. R., Haseloff, J., St Johnston, D. and Brand, A. H. (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev* 12, 1847-57.

Schweisguth, F. (1995). *Suppressor of Hairless* is required for signal reception during lateral inhibition in the *Drosophila* pupal notum. *Development* **121**, 1875-1884.

Schweisguth, F. and Lecourtois, M. (1998). The activity of *Drosophila Hairless* is required in pupae but not in embryos to inhibit Notch signal transduction. *Dev. Genes Evol.* 208, 19-27.

Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R. and Shilo, B. Z. (1995). Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev* 9, 1518-29.

Seery, J. P. and Watt, F. M. (2000). Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium. *Curr Biol* 10, 1447-50.

Semper, L. F. (1857). Z. wiss. Zool. 8, 326-339.

Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M. (1997). Transcriptional regulation of *Notch* and *Delta*: requirement for neuroblast segregation in *Drosophila*. *Development* **124**, 2015-2025.

Shanbhag, S. R., Muller, B. and Steinbrecht, R. A. (1999). Atlas of olfactory organs of Drosophila melanogaster. 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int J Insect Morphol Embryol* **28**, 377-397.

Shen, C. P., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in Drosophila. *Cell* **90**, 449-58.

Shen, C. P., Knoblich, J. A., Chan, Y. M., Jiang, M. M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1998). Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufen and Prospero during asymmetric cell division in Drosophila. *Genes and Development* **12**, 1837-46.

Shen, Q., Zhong, W., Jan, Y. N. and Temple, S. (2002). Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development* **129**, 4843-53.

Shepherd, D. and Smith, S. A. (1996). Central projections of persistent larval sensory neurons prefigure adult sensory pathways in the CNS of Drosophila. *Development* **122**, 2375-84.

Shulman, J. M., Perrimon, N. and Axelrod, J. D. (1998). Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends Genet* 14, 452-8.

Simpson, P. (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr Opin Genet Dev* 7, 537-42.

Simpson, P., Woehl, R. and Usui, K. (1999). The development and evolution of bristle patterns in Diptera. *Development* 126, 1349-64.

Singh, R. N. (1997). Neurobiology of the gustatory systems of Drosophila and some terrestrial insects. *Microsc Res Tech* **39**, 547-63.

Skaer, N., Pistillo, D., Gibert, J. M., Lio, P., Wulbeck, C. and Simpson, P. (2002a). Gene duplication at the achaete-scute complex and morphological complexity of the peripheral nervous system in Diptera. *Trends Genet* **18**, 399-405.

Skaer, N., Pistillo, D. and Simpson, P. (2002b). Transcriptional heterochrony of scute and changes in bristle pattern between two closely related species of blowfly. *Dev Biol* 252, 31-45.

Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* 5, 984-995.

Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* **114**, 939-946.

Skeath, J. B. and Doe, C. Q. (1996). The achaete-scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the Drosophila CNS. *Curr Biol* **6**, 1146-52.

Snodgrass, R. E. (1929). The morphology of insect sense organs and the sensory nervous system. *Smithson Misc; Coll.* **77**, 1-80.

Snow, P. M., Patel, N. H., Harrelson, A. L. and Goodman, C. S. (1987). Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in Drosophila and grasshopper embryos. *J Neurosci* 7, 4137-44.

Sorokina-Agafonova, M. (1924). Das Verhalten des peripheren Nervensystems der Insekten in Metamorphose. Z. Anat. Entw. Gesch. 74, 318-322.

Spana, E. P. and Doe, C. Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**, 3187-3195.

Spana, E. P., Kopczynski, C., Goodman, C. S. and Doe, C. Q. (1995). Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the Drosophila CNS. *Development* **121**, 3489-3494.

Stern, C. (1954). Two or three bristles. Am. Scientist 42, 213-247.

Stern, D. L. (1998). A role of Ultrabithorax in morphological differences between Drosophila species. *Nature* **396**, 463-6.

Stocker, R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in Drosophila melanogaster: a review. *Cell Tissue Res* 275, 3-26.

Stocker, R. F. (2001). Drosophila as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microsc Res Tech* **55**, 284-96.

Stossberg, M. (1937). Über die Entwicklung der Schmetterlingsschuppen. *Biol. Zbl.* 57, 393-402.

Stossberg, M. (1938). Die Zellvorgänge bei der Entwicklung der Flügelschuppen von *Ephestia kühniella. Z. Morph. Ökol Tiere* **34**, 173-206.

Struhl, G., Fitzgerald, K. and Greenwald, I. (1993). Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* **74**, 331-345.

Sucena, E. and Stern, D. L. (2000). Divergence of larval morphology between Drosophila sechellia and its sibling species caused by cis-regulatory evolution of ovo/shaven-baby. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4530-4.

Sudarsan, V., Pasalodos-Sanchez, S., Wan, S., Gampel, A. and Skaer, H. (2002). A genetic hierarchy establishes mitogenic signalling and mitotic competence in the renal tubules of Drosophila. *Development* **129**, 935-44.

Süffert, F. (1937). Die Geschichte der Bildungszellen im Puppenflügelepithel bei einem Tagschmetterling. *Biol. Zbl.* 57, 615-628.

Sun, B. and Salvaterra, P. M. (1995). Characterization of nervana, a Drosophila melanogaster neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. *J Neurochem* 65, 434-43.

Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1998). Transcriptional regulation of *atonal* during development of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Development* **125**, 3731-3740.

Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2000). Ectopic scute induces Drosophila ommatidia development without R8 founder photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6815-9.

Taghert, P. H., Doe, C. Q. and Goodman, C. S. (1984). Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo. *Nature* **307**, 163-5.

Tepass, U. and Hartenstein, V. (1995). Neurogenic and proneural genes control cell fate specification in the Drosophila endoderm. *Development* **121**, 393-405.

Tix, S., Bate, M. and Technau, G. (1989). Pre-existing neuronal pathways in the leg imaginal discs of *Drosophila*. *Development* 107, 855-862.

Tracey, W. D., Wilson, R. I., Laurent, G. and Benzer, S. (2003). painless, a Drosophila Gene Essential for Nociception. *Cell* **113**, 261-73.

Tsacas, L. and Bachili, G. (1991). *Drosophila sechellia*. n. sp., huitième espèce du sousgroupe melanogaster des îles Sechelles (Diptera, Drosophilidae). *Rev Fr Entomol* **3**, 146-150.

Turner, F. T. and Mahowald, A. P. (1979). Scanning electron microscopy of *Drosophila* melanogaster embryogenesis. III. Formation of head and caudal segments. *Dev Biol* 68, 96-109.

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

Umesono, Y., Hiromi, Y. and Hotta, Y. (2002). Context-dependent utilization of Notch activity in Drosophila glial determination. *Development* **129**, 2391-9.

Usui, K. and Kimura, K. (1993). Sequential emergence of the evenly spaced microchaetes on the notum of *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 151-158.

Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M. and Uemura, T. (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-95.

Usui-Ishihara, A., Simpson, P. and Usui, K. (2000). Larval multidendrite neurons survive metamorphosis and participate in the formation of imaginal sensory axonal pathways in the notum of Drosophila. *Dev Biol* 225, 357-69.

Vaessin, H., Brand, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). *daughterless* is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 935-945.

Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1991). prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in Drosophila. *Cell* 67, 941-53.

Van De Bor, V. and Giangrande, A. (2001). Notch signaling represses the glial fate in fly PNS. *Development* **128**, 1381-90.

Van De Bor, V., Walther, R. and Giangrande, A. (2000). Some fly sensory organs are gliogenic and require glide/gcm in a precursor that divides symmetrically and produces glial cells. *Development* **127**, 3735-43.

Van Doren, M., Ellis, H. M. and Posakony, J. W. (1991). The Drosophila extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. Development 113, 245-255.

Verdi, J. M., Schmandt, R., Bashirullah, A., Jacob, S., Salvino, R., Craig, C. G., Program, A. E., Lipshitz, H. D. and McGlade, C. J. (1996). Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate. *Curr Biol* **6**, 1134-45.

Vervoort, M., Merritt, D. J., Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1997). Genetic basis of the formation and identity of type I and type II neurons in *Drosophila* embryos. *Development* **124**, 2819-2828.

Villares, R. and Cabrera, C. V. (1987). The *achaete-scute* gene complex of D. melanogaster: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* **50**, 415-424.

Vogel, R. (1923). Zur Kenntnis des feineren Baues der Geruchsorgane der Wespen und Bienen. Z. wiss. Zool. 120, 281-324.

vom Rath, O. (1888). Zur kenntnis der Hautsinnesorgane und des sensiblen Nerven systems der Arthropoden. Z. wiss. Zool. 46, 449-538.

Wakamatsu, Y., Maynard, T. M., Jones, S. U. and Weston, J. A. (1999). NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron* 23, 71-81.

Wakamatsu, Y., Maynard, T. M. and Weston, J. A. (2000). Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development* **127**, 2811-21.

Walker, R. G., Willingham, A. T. and Zuker, C. S. (2000). A Drosophila mechanosensory transduction channel. *Science* 287, 2229-34.

Wan, S., Cato, A. M. and Skaer, H. (2000). Multiple signalling pathways establish cell fate and cell number in Drosophila malpighian tubules. *Dev Biol* **217**, 153-65.

Wang, S., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1997). Only a subset of the binary cell fate decisions mediated by Numb/Notch signaling in Drosophila sensory organ lineage requires Suppressor of Hairless. *Development* **124**, 4435-46.

Wang, X., Sun, B., Yasuyama, K. and Salvaterra, P. M. (1994). Biochemical analysis of proteins recognized by anti-HRP antibodies in Drosophila melanogaster: identification and characterization of neuron specific and male specific glycoproteins. *Insect Biochem Mol Biol* 24, 233-42.

Ward, E. J. and Skeath, J. B. (2000). Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the Drosophila embryo. *Development* **127**, 4959-69.

White, K. (1980). Defective neural development in Drosophila melanogaster embryos dficient for the tip of the X chromosome. *Dev Biol* 80, 332-344.

Whittle, J. R., Tiong, S. Y. and Sunkel, C. E. (1986). The effect of lethal mutations and deletions within the bithorax complex upon the identity of caudal metameres in the Drosophila embryo. *J Embryol Exp Morphol* **93**, 153-66.

Wigglesworth, V. (1940). Local and general factors in the development of "pattern" in *Rodnius prolixus* (Hemiptera). *J Exp Biol* **17**, 180-200.

Wigglesworth, V. (1953). The origin of sensory neurones in an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Micr. Sci.* 94, 93-112.

Williams, D. W. and Shepherd, D. (1999). Persistent larval sensory neurons in adult Drosophila melanogaster. *J Neurobiol* **39**, 275-86.

Wittkopp, P. J., Vaccaro, K. and Carroll, S. B. (2002). Evolution of yellow gene regulation and pigmentation in Drosophila. *Curr Biol* **12**, 1547-56.

Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *Journal of Cell Biology* **150**, 1361-74.

Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.

Wulbeck, C. and Simpson, P. (2000). Expression of achaete-scute homologues in discrete proneural clusters on the developing notum of the medfly Ceratitis capitata, suggests a common origin for the stereotyped bristle patterns of higher Diptera. *Development* **127**, 1411-20.

Wulbeck, C. and Simpson, P. (2002). The expression of pannier and achaete-scute homologues in a mosquito suggests an ancient role of pannier as a selector gene in the regulation of the dorsal body pattern. *Development* **129**, 3861-71.

Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. and Montell, C. (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system. *Genes Dev* 8, 981-94.

Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J. and Zoghbi, H. Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**, 2155-8.

Ye, Y. and Fortini, M. E. (2000). Proteolysis and developmental signal transduction. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **11**, 211-21.

Yeates, D. K. and Wiegmann, B. M. (1999). Consensus and controversy: toward a higherlevel phylogeny of Diptera. *Ann Rev Ent* 44, 397-428.

Yip, M. L., Lamka, M. L. and Lipshitz, H. D. (1997). Control of germ-band retraction in Drosophila by the zinc-finger protein HINDSIGHT. *Development* **124**, 2129-41.

Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of Drosophila asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.

Zawarzin, A. (1912). Histologische Studien über Insekten. II: Das sensible Nervensystem der *Aeschna* Larven. *Z. wiss. Zool.* **100**, 245-286.

Zeng, C., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1998). Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. *Genes Dev.* **12**, 1086-1091.

Zhao, C. and Emmons, S. W. (1995). A transcription factor controlling development of peripheral sense organs in C. elegans. *Nature* **373**, 74-8.

Zhong, W., Feder, J. N., Jiang, M. M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996). Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* **17**, 43-53.

zur Lage, P., Jan, Y. N. and Jarman, A. P. (1997). Requirement for EGF receptor signalling in neural recruitment during formation of Drosophila chordotonal sense organ clusters [see comments]. *Curr Biol* **7**, 166-75.

RÉSUMÉ

Formation des organes sensoriels chez *D. melanogaster* : lignages cellulaires, apoptose et évolution

Virginie Orgogozo

Les cellules qui composent un animal pluricellulaire sont extraordinairement variées. Grâce à son organisation simple et extrêmement reproductible, le système nerveux périphérique de la larve de *D. melanogaster* constitue un système idéal pour étudier comment des cellules différentes sont produites à partir d'une seule cellule précurseur au cours du développement. Durant ma thèse, je me suis intéressée à quatre aspects!:

1) **Lignage cellulaire et polarité cellulaire**. Une controverse subsistait à propos du lignage cellulaire des organes sensoriels externes de l'embryon. En analysant les divisions cellulaires sur des embryons fixés à différents stades du développement, j'ai observé que chaque organe dérive d'une cellule précurseur primaire (pI). Cette cellule subit une séquence de quatre divisions cellulaires asymétriques (lignage md-es) et produit les quatre cellules de l'organe externe ainsi qu'un neurone multidendritique (md) qui ne fait pas partie de l'organe. Cette description a permis de résoudre la controverse et a ouvert la voie aux études des divisions asymétriques sensorielles dans l'embryon.

2) **Mort cellulaire**. Un neurone multidendritique particulier provient d'un lignage cellulaire différent, au cours duquel ont lieu deux mitoses successives (lignage md-solo). Suite à chaque division, une des deux cellules filles entre en apoptose. Cette décision de vie ou de mort d'une des deux cellules filles est contrôlée par la voie de signalisation Notch et son inhibiteur Numb. De plus, le gène Hox *AbdB* est responsable d'une partie de l'activation de la mort cellulaire dans le segment abdominal 8 de l'embryon. Dans des mutants où l'apoptose est bloquée, les deux cellules qui devaient mourir se divisent et le lignage md-solo est transformé en lignage md-es. Ces résultats indiquent que le lignage md-solo est en fait un lignage md-es dans lequel deux cellules entrent en apoptose.

3) **Migration cellulaire**. La protéine Slit est sécrétée par les cellules de la ligne médiane de l'embryon et repousse les axones ainsi que certaines cellules chez les Vertébrés et les Protostomiens. J'ai montré que Slit empêche également les cellules sensorielles de traverser la ligne médiane au cours de l'embryogenèse.

4) **Evolution**. Mon travail et une ré-interprétation des modèles de lignage sensoriels proposés précédemment suggèrent que les lignages qui produisent la majorité des organes sensoriels de *D. melanogaster* sont dérivés d'un lignage canonique via un nombre limité de modifications. Ces modifications concernent le type de cellules formées, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et le recrutement de cellules voisines.

L'analyse des organes sensoriels chez d'autres espèces de Drosophilidés indique que le patron des organes sensoriels des segments abdominaux de la larve de *D. melanogaster* n'a pas changé depuis plus de 60 millions d'années. Dans les embryons de *D. busckii*, une cellule précurseur primaire suit un lignage md-solo au lieu de suivre un lignage md-es comme chez *D. melanogaster*. Le patron des organes sensoriels a donc évolué grâce à la transformation d'un lignage cellulaire en un autre.