THÈSE

Présentée à l'Université Louis Pasteur Strasbourg I
Faculté des Sciences de la Vie pour obtenir le titre de :

Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
Domaine : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Servane TAUSZIG-DELAMASURE

« Activation et signalisation de la réponse immunitaire innée chez la drosophile : rôle des récepteurs Toll. »

Soutenue le 28 Mars 2003 devant la commission d'examen :

Pr. Herman WAGNER
Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Münich.

Pr. Jorge MOSCAT
CBMSO, Universidad Autonoma, Canto Blanco, Madrid.

Pr. Thierry MARTIN
Institut D'Hématologie, Strasbourg.

Pr. Jules HOFFMANN
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg.

Pr. Jean-Luc IMLER
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Jules Hoffmann, qui m'a permis de réaliser mon DEA et ma thèse dans son laboratoire. Je vous suis très reconnaissante des conditions exceptionnelles dans lesquelles j'ai eu la chance de travailler pendant ces 4 ans, tant sur le plan matériel que sur le plan intellectuel. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à nos travaux, pour les opportunités que vous m'avez données d'aller à Boston dans le cadre d'un projet NIH, à Angers, et de participer à plusieurs congrès. Merci encore pour les véritables démonstrations de « l'art d'écrire » lors de la rédaction du manuscrit Spätzle! Enfin, merci pour l'ouverture internationale que vous donnez au laboratoire et la passion avec laquelle vous promouvez nos travaux, nous y gagnons tous beaucoup.

I am thankful to Pr. Wagner, Pr. Moscat, and Pr. Martin, who accepted to read this manuscript and to evaluate my work. It is a great pleasure to meet you and to discuss this thesis with you.

Merci à Jean-Luc Imler, qui a été un « adviser » exceptionnel. Merci de m'avoir fait confiance malgré mon bagage technologique « décalé » et le sac de lacunes et de doutes avec lequel je suis arrivée. Merci de m'avoir tant appris, mais surtout, et je crois que c'est l'essentiel, merci d'avoir fait naître une vocation! Merci pour la transmission de ton enthousiasme intellectuel, de ton œil critique, ta curiosité, ta recherche de l'astuce et de l'élégance scientifique, tes revues « people » au retour des congrès, la leçon de rédaction, les petits pains du lundi matin, ton perfectionnisme et ta faculté à captiver un auditoire de congrès ou un amphi de Deug, le tour des bons restos de Strasbourg et…la fameuse tarte au citron meringuée !!!!! Merci pour ce duo de patience et d'exigence, il n'y a pas eu de temps mort au cours de ces quatre années et c'est grâce à cette passion qui t'anime. Merci pour l'esprit d'équipe que tu as soutenu et qui a rendu à ces quatre années de thèse si positives. Enfin, merci d'avoir laissé de la place à mes autres priorités….tu sais ma gratitude…

Merci à Hugues Gascan et Eric Lelièvre de m'avoir permis de réaliser les manips de iodination de Spätzle ainsi que les expériences de Binding à Angers. Merci pour l'accueil chaleureux de toute l'équipe, et surtout pour la disponibilité et l'énergie d'Eric, que ce soit derrière un « tablier Dark Vador » ou avec une raquette de squash… Merci aussi à Caroline pour les transfections nocturnes, les allers-retour matinaux (très matinaux !) et les pauses gastronomiques!

I would like to thank Nick Gay, Alexander Weber and the GlaxoSmithKline team in Cambridge for our collaboration. It was a great pleasure and a very nice experience to collaborate with you on the Spätzle project.

I would also like to express my gratitude to Professor Alan Ezekowitz and Dr Thilo Stehle who welcomed me in the first year of my PhD in the frame of a NIH project. Thank you for your enthousiastic support, my discovery of the « wonderful

world of proteins» and the most beautiful view over Boston ever seen from a bench! I have fond memories of my stay in your team at the MGH.

Merci à Olivier Poch pour l'alignement et l'arbre phylogénétique des protéines à domaine TIR …et la quête du bootstrap...

Merci à Hana…un des plus beaux cadeaux que cette thèse m'ait apporté… mon bulwark, ma Dancin'Queen des paillasses, ma petite anglaise en croisade, mon hystérique slave préférée, mon amie…tu as été auprès de moi dans les moments les plus heureux et les plus douloureux…le quotidien dans tout ce qu'il a de plus doux et de plus affectueux…vivement tous nos petits thés à venir…merci, merci, merci….

Merci à Estelle, autre facette adorable du quotidien, merci pour toutes les manips que tu as sauvées avec excellence…et longue route, tu le mérites ! Merci à Catherine aussi …(champeusssss !)

Merci à Marie et Dominique pour la lecture, les corrections et l'intérêt que vous avez porté à ce manuscrit (même en vacances !).

Merci à tous ceux qui m'ont aidé techniquement tout au long de ces quatre années au laboratoire : Miquette pour les cellules, Claude pour les séquences, Reine pour les Northern, Marie-Eve et Martine pour les microorganismes, Julien pour les transferts d'hémolymphes, Maria pour les mouches et les localisations chromosomiques, Laure, Rachel et Raymonde pour le bien-être des mouches, Nadège, Francine, David et Laurence pour les colorations et la purification des protéines, Catherine pour les observations GFP, René et Daniel pour les dissections et Paule pour tout le reste!

Merci à l'UPR9022, un code qui regroupe des gens pour qui je porte beaucoup d'affection, merci aux fiiiiiiiilles, merci à Miquette pour les critiques musicales affûtées et surtout les moments précieux au cœur des journées de boulot, merci à Julien pour cette autre idée de la Science qui m'accompagnera à l'avenir je l'espère, merci à Manue pour ces bons souvenirs de début de thèse et tout ce que tu m'as appris, merci à Paulounette pour le « bureau du réconfort », Merci à Petros (un grand vide derrière moi), merci à Sylvia pour les petits cafés, la salsa et la Sardaigne, merci à Christine, conseillère précieuse à mes carrefours existentiels et rubrique Télérama croustillante, merci à Reine et Sophie pour les vrais challenges au quotidien comme un concours de béarnaise, merci à Emmanuel et Esther les docs pour votre soutien et votre attention dans les moments critiques. Merci à Maria pour l'apprentissage de la génétique, merci à Vincent, le mécène de l'avant garde jazz-rock-bohème, merci à Daniel et Maurice pour la découverte des bestioles en tous genres, merci à Bernard, pour tout ce temps passé à dompter les machines! Et merci aux autres, selon la sagesse grecque, je suis triste de vous quitter, ça veut tout dire….

Merci aux zamis, aux nénettes, toujours là dans les moments importants, vous savez combien vous composez ma vie et combien vous m'êtes précieux…

Merci à Néfertari et Horus de la vallée de l'Oise pour les bienfaits du Nil…

Une pensée émue pour ma famille, mes frères pour le fameux « unrelenting support » dont j'ai aussi bénéficié, et mes parents…mon coach le plus fidèle et ma petite fée qui me montre chaque jour comment affronter l'adversité avec malice, intelligence, et amour.

Enfin, merci à mon compagnon de route, qui éclaire ma vie d'un bonheur inouï…

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 1
SOMMAIRE 3
INDEX DES FIGURES 5
INTRODUCTION 7
I. La réponse immunitaire de la drosophile. 9
I.1. La réponse cellulaire. 9
I.1.a. La phagocytose 9
I.1.b. Mélanisation et encapsulemement. 11
I.2. La réponse humorale. 11
II. La voie Toll de drosophile. 12
III. La voie IMD de la drosophile. 15
IV. Les TLRs de mammifères. 17
IV. 1. Activation des TLRs. 17
IV. 2. Signalisation des TLRs. 19
IV. 3. TLRs et réponse immunitaire adaptative. 20
IV. 4. TLRs et pathologies. 21
RESULTATS 24
Partie I. LA FAMILLE DES RECEPTEURS TOLL CHEZ LA DROSOPHILE 25
I.1. Identification de 9 récepteurs Toll dans le génome de la drosophile. 26
I.1.a. Article 1. 26
I.1.b. Critique du test des récepteurs chimériques . 28
I. 2. Toll-9 présente des caractéristiques structurales et fonctionnelles des TLRs de mammifères. 28
I.2.a. Séquence et structure de Toll-9. 28
I.2.b. Profil d'expression de Toll-9 au cours du développement de la drosophile. 29
I.2.c. Surexpression de Toll-9 dans les cellules S2 en culture. 29
I.2.d. Surexpression de Toll-9 in vivo. 30
Partie II. DmMyD88, un nouveau composant de la voie Toll. 32
II.1. DmMyD88 appartient à la voie Toll et est impliqué dans la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif. 33
II.1.a. Article 2. 33
II.1.b. Sauvetage du phénotype immunitaire de la lignée PBc03881 déficiente pour DmMyD88. 35
I.2. DmMyD88 est aussi nécessaire en aval de Toll-5 et Toll-9. 35
I.2.a. DmMyD88 interagit avec Toll-9 dans les cellules S2. 35
I.2.b. Une version dominant-négative de DmMyD88 inhibe l'activation du promoteur de la drosomycine par Toll5ΔLRR et Toll9ΔLRR dans les cellules S2. 36
Partie III. Toll fonctionne comme un récepteur de cytokine. 37
III.1. Article 3. 38
III.2. Un corécepteur pour Toll ? 40
DISCUSSION 41
I. Les Tolls de drosophile et les TLRs de mammifères définissent deux sous-familles de récepteurs. 42
I. 1. Différence des ectodomaines. 42
I. 1. a. Le motif N-flank est spécifique des Tolls de drosophile. 42

I. 1. b. Les motifs C-flank. 45
I. 2. Diversité au niveau du domaine TIR. 46
I. 3. Conclusions et perspectives. 49

II. Reconnaissance du non-soi et activation de la réponse immunitaire innée chez la drosophile. 51
II. 1. Reconnaissance des bactéries à Gram-positif et des champignons. Activation de la voie Toll. 51
II. 2. La fonction de Toll chez la drosophile est similaire à celle du récepteur de l'IL-1 chez les mammifères. 53
II. 3. Reconnaissance des bactéries à Gram-négatif. 54

MATÉRIEL ET MÉTHODES 57
I. INTERFERENCE PAR ARN DOUBLE-BRIN DANS LES CELLULES DE SCHNEIDER S2. 58
I. 1. Transcription in vitro. 58
I. 2. Transfection des cellules par précipitation au phosphate de calcium. 59
I. 3. Transfection des cellules avec le kit lipofectin. 59
II. IMMUNOPRÉCIPITATIONS. 61
III. EXPÉRIENCES DE LIAISON D'UN LIGAND À SON RÉCEPTEUR. 61
III. 1. Marquage de la protéine à l'iode radioactif. 61
III. 2. Scatchard. 62
III. 3. Cross-linking. 62

ANNEXES 64
ANNEXE I 65
ANNEXE II 66
ANNEXE III 67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 68

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Voie de signalisation de la mise en place de l'axe dorso-ventral de la drosophile. **Page 12.**

Figure 2. Voies de régulation des peptides antimicrobiens chez la drosophile. **Page 13.**

Figure 3. Structure des récepteurs à domaine TIR. **Page 13.**

Figure 4. Représentation schématique de la structure des récepteurs Toll chez la drosophile et l'homme. **Page 17.**

Figure 5. Voies d'activation induites par TLR2 et TLR4 chez les mammifères. **Page 19.**

Figure 6. La surexpression dans les cellules S2 de Toll-8 en combinaison avec les autres Tolls n'induit pas de synergie pour l'activation du promoteur de l'attacine. **Page 28.**

Figure 7. Toll-9 est phylogénétiquement et structuralement plus proche des TLRs que des Tolls. **Page 29.**

Figure 8. Profil d'expression du transcrit Toll-9 au cours du développement. **Page 29.**

Figure 9. Toll9 n'est pas impliqué dans l'induction du peptide antibactérien Attacine, mais active le promoteur du gène codant le peptide antifongique Drosomycine via Pelle. **Page 29.**

Figure 10. La surexpression de Toll-9 *in vivo* induit l'expression constitutive de la Drosomycine via Pelle. **Page 30.**

Figure 11. L'expression ectopique du trangène *UAS-DmMyD88* dans la lignée PBc03881, dans laquelle la transcription de *DmMyD88* est affectée, restaure la résistance aux infections fongiques. **Page 33.**

Figure 12. DmMyD88 interagit spécifiquement avec Toll et Toll-9. **Page 35.**

Figure 13. Toll, Toll-5 et Toll-9 induisent l'activation du promoteur de la *drosomycine via* DmMyD88 dans les cellules S2. **Page 36.**

Figure 14. L'activation du promoteur de la *drosomycine* dans les cellules S2 par SpzC106 est dépendante de Toll mais pas des autres membres de la famille. **Page 40.**

Figure 15. Structure des produits des allèles gain de fonction ou perte de fonction de *Toll*, isolés lors d'un crible de mutagénèse saturante du troisième chromosome chez la drosophile (Schneider *et al*, 1991). **Page 43.**

Figure 16. Profil d'expression dynamique et tissus-spécifique des Tolls dans l'embryon, d'après Kambris *et al.* 2002. **Page 43.**

Figure 17. Spätzle et les familles des protéines qui lui sont apparentées. **Page 44.**

Figure 18. Structure du domaine TIR d'après Xu *et al* 2000. **Page 47.**

Figure 19. Cascades protéolytiques activant Spätzle chez la drosophile et la molécule apparentée, le Coagulogène chez la limule. **Page 52.**

Figure 20. Activation de l'expression d'un peptide antimicrobien induite par une cytokine chez les mammifères et la drosophile. **Page 53.**

Figure 21. «Modules moléculaires» conservés, et intégrés dans différentes voies de signalisation pour répondre le plus efficacement possible aux signaux d'infection chez l'homme, chez la drosophile et chez la limule. **Page 56.**

INTRODUCTION

Les organismes multicellulaires sont en confrontation permanente avec les pathogènes de leur environnement. Leur première ligne de défense est la réponse immunitaire innée. Elle met en place des mécanismes comme la phagocytose ou la synthèse de peptides antimicrobiens. Chez les vertébrés, elle active et oriente une deuxième ligne de défense constituée de la réponse immunitaire adaptative, qui se met en place après plusieurs jours. En effet, la réponse immunitaire adaptative implique l'amplification de populations de lymphocytes exprimant des récepteurs réarrangés, spécifiquement dirigés contre les antigènes des microorganismes infectieux. La réponse immunitaire innée, en revanche, est déclenchée dans les minutes qui suivent l'infection, car elle repose sur un contingent de molécules sentinelles préformées: les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ces récepteurs sont répartis à la surface des cellules qui se trouvent les premières en contact avec les agents infectieux : les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules dendritiques. Ces récepteurs ont la faculté de reconnaître des motifs conservés à la surface des microorganismes infectieux, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Parmi les PAMPs étudiés, on peut citer le LPS (Lipopolysaccharide), le LTA (acide lipotéchoïque) et le PGN (peptidoglycane) qui composent la paroi des bactéries (Medzhitov and Janeway, 1997).

La nature des PRRs est longtemps restée inconnue jusqu'à la découverte du rôle clé du récepteur Toll de la drosophile dans la réponse aux pathogènes de type champignons ou bactéries à Gram-positif (Lemaitre et al., 1996). L'attention a alors été portée sur les récepteurs apparentés à Toll, qui font l'objet de cette thèse. Cette introduction présente les mécanismes de la réponse immunitaire de la drosophile et le rôle des TLRs (Toll-like Receptors) dans la réponse immunitaire innée des mammifères.

I. La réponse immunitaire de la drosophile.

La drosophile est un excellent modèle pour étudier la réponse immunitaire innée, d'une part parce que, comme tous les invertébrés, c'est le seul type de réponse dont elle dispose et d'autre part, en raison des nombreux outils génétiques disponibles. En réponse à une infection, la drosophile met en place plusieurs mécanismes de défense : la phagocytose, l'encapsulement, la mélanisation et la synthèse de peptides antimicrobiens.

I.1. La réponse cellulaire.

La drosophile possède un système circulatoire ouvert qui contient l'hémolymphe (le sang de la drosophile), pompée par le vaisseau dorsal. A la fin de l'embryogénèse, l'organe hématopoïétique larvaire se différencie : il s'agit des glandes de la lymphe qui assurent l'essentiel de la production d'hémocytes (cellules sanguines). Cet organe disparaîtra à la métamorphose. La larve possède quelques milliers d'hémocytes qui se répartissent en trois catégories :

- les plasmatocytes : ils constituent plus de 90% des hémocytes et sont des cellules phagocytaires qui présentent des similarités fonctionnelles avec les monocytes et macrophages des mammifères.
- les lamellocytes sont impliqués dans l'encapsulement de pathogènes volumineux.
- les cellules à cristaux contiennent les enzymes et les produits nécessaires à la cascade de mélanisation.

Chez l'adulte, on n'observe plus que les plasmatocytes (Lanot et al., 2001) (Lebestky et al., 2003) (Duvic et al., 2002).

I.1.a. La phagocytose

Pendant l'embryogénèse et la métamorphose, les plasmatocytes phagocytent les cellules apoptotiques et les débris tissulaires (Tepass et al., 1994) (Franc et al., 1996). Les plasmatocytes sont aussi capables de phagocyter des bactéries (Lanot et al., 2001). Afin de déterminer leur rôle dans la réponse cellulaire à une infection, des mutants ont été étudiés. L'équipe de Marie Meister a étudié la survie de deux

mutants en parallèle, au stade larvaire et après injection de bactéries. Les larves mutantes pour *domino* (*dom*) ont un défaut de prolifération des hémocytes et les larves *Black cell* (*Bc*) présentent un défaut de mélanisation (voir ci-dessous). La combinaison du déficit en hémocytes et l'absence de mélanisation chez les doubles mutants *domino* / *Bc* rend les larves considérablement plus sensibles aux infections bactériennes (Braun et al., 1998) mettant ainsi en évidence l'importance des hémocytes. Dans une étude indépendante, Basset *et al.* ont montré qu'en réponse à une infection naturelle par voie orale, l'induction des peptides antimicrobiens dans le corps gras (réponse humorale, cf. partie I.2.) est affectée dans les mutants *domino* et *l(3)hem*, qui présentent également un déficit en hémocytes (Basset et al., 2000). En revanche, la réponse humorale de ces larves mutantes est normale si l'infection résulte d'une blessure. Ces données montrent que les hémocytes activent la réponse humorale à une infection en absence de blessure. Chez la mouche adulte, les travaux du groupe de D.Schneider ont montré que l'on peut saturer la fonction phagocytaire des hémocytes chez l'adulte en injectant des billes de polystyrène dans l'abdomen. La susceptibilité des mutants de la réponse antibactérienne humorale à une infection par *E. coli* est alors considérablement augmentée (Elrod-Erickson et al., 2000).

Ces études montrent que les plasmatocytes jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de la drosophile, en synergie avec les autres effecteurs immunitaires. Il a récemment été montré que le récepteur de type « scavenger » dSR-CI est impliqué dans la phagocytose des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif (Ramet et al., 2001). Cependant, les mécanismes précis de la phagocytose restent encore mal connus. Un système d'opsonisation pourrait intervenir. En effet, quatre gènes, dTEP1 à 4 (Thioester containing protein) ont récemment été caractérisés chez la drosophile. Ils codent des protéines présentant des similarités avec la superfamille des C3/α_2-macroglobulines du Complément (Lagueux et al., 2000). Un homologue de cette famille a été également identifié chez le moustique *Anopheles gambiae*.Il est impliqué dans l'opsonisation et la phagocytose de bactéries à Gram-négatif par les macrophages de moustique (Levashina et al., 2001).

I.1.b. Mélanisation et encapsulemement.

La rupture de la cuticule déclenche la mélanisation au niveau de la blessure, on observe alors une tache noire. La mélanisation résulte d'une cascade biochimique qui aboutit à la production de la mélanine. Une enzyme importante de cette cascade est la phénoloxydase qui catalyse la réaction d'oxydation des phénols en quinones, toxiques pour les microorganismes (pour revue (Soderhall and Cerenius, 1998)). La phénoloxydase existe sous forme de zymogène (proPO) dans les cellules à cristaux (Rizki and Rizki, 1984). Lors d'une infection, la proPO est libérée dans l'hémolymphe, elle va être clivée et activer la cascade de mélanisation. La proPO n'est pas sécrétée dans les mutants *Bc*, d'où la coloration noire des cellules à cristaux qui donne son nom aux mutants. La mélanisation semble impliquée dans la résistance aux infections : outre la sensibilité à l'infection bactérienne des larves mutantes pour *Bc* et *dom* mentionnées ci-dessus (Braun et al., 1998), un article récent montre que des mutants pour la serpine Spn27A qui contrôle la cascade de mélanisation présentent une susceptibilité accrue aux infections fongiques (De Gregorio et al., 2002a), (Ligoxygakis et al., 2002b).

L'encapsulement est observé lorsque le pathogène est de taille trop importante pour être phagocyté par les plasmatocytes. C'est le cas, par exemple, lorsque la guêpe *Leptopilina boulardi* pond ses œufs dans la larve de drosophile (Carton and Nappi, 2001). Les lamellocytes, qui ne sont pas observés dans les larves saines, se différencient dans ce cas et viennent entourer les parasites. Les lamellocytes sont de grandes cellules plates allongées qui forment plusieurs couches, constituant ainsi la capsule. Cette capsule est alors mélanisée. Le parasite meurt ensuite, probablement par asphyxie, mais également sous l'effet cytotoxique de certains produits de la réaction de mélanisation, comme des résidus oxygénés (pour revue (Tzou et al., 2002)).

I.2. La réponse humorale.

Le mécanisme de défense le plus étudié à ce jour chez la drosophile est la synthèse inductible dans le corps gras (équivalent fonctionnel du foie des mammifères) d'une batterie de peptides antimicrobiens. Ces peptides ont des spectres d'activités variés dirigés contre des bactéries ou contre des champignons et

sont sécrétés dans l'hémolymphe, dans les heures qui suivent l'infection (Bulet et al., 1999). Certains de ces peptides, comme la Drosomycine et la Metchnikowine, ont une activité antifongique (Levashina et al., 1995), (Fehlbaum et al., 1994). La Cécropine allie une activité antifongique et une activité antimicrobienne (Ekengren and Hultmark, 1999). D'autres peptides sont actifs contre les bactéries à Gram-négatif (Drosocine et Diptéricine) ou contre les bactéries à Gram-positif (Défensine) (Bulet et al., 1999). Le mode d'action des peptides antimicrobiens n'est pas encore clairement élucidé, mais il semble que certains déstabilisent la paroi des microorganismes alors que d'autres peuvent y créer des pores (pour revue (Lehrer and Ganz, 1999)). Les peptides antimicrobiens participent à la réponse systémique de la drosophile, mais ils sont également sécrétés localement dans les épithélias de surface comme les trachées ou le système digestif (Tzou et al., 2000), (Ferrandon et al., 1998).

Ces peptides dont l'expression est induite en réponse à l'infection sont utilisés dans nos études comme marqueurs de l'activation de la réponse immunitaire. L'étude de la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens a permis de mettre en évidence deux voies de transduction du signal : la voie Toll et la voie IMD.

II. La voie Toll de drosophile.

Le récepteur Toll a été découvert au début des années 1980s pour son rôle dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon de drosophile (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984) (Figure 1). Lors de ce processus développemental, le clivage de Spätzle résulte de la cascade protéolytique impliquant Nudel, Gastrulation defective et la serine protéase Snake qui clive Easter (Dissing et al., 2001), (LeMosy et al., 2001). Finalement Easter clive Spätzle (DeLotto and DeLotto, 1998). Une fois activé, Toll induit une cascade de transduction qui implique Tube, Pelle et le complexe Cactus-Dorsal. La phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur Cactus induisent la libération de Dorsal qui passe dans le noyau et active la régulation des gènes cibles qui établissent la ventralisation de l'embryon (revu dans (LeMosy et al., 1999) et (Belvin and Anderson, 1996)).

En 1996, B.Lemaître au laboratoire a observé que la cassette de gènes *spätzle*, *Toll*, *tube*, *pelle* et *cactus* contrôle la réponse antifongique de la drosophile et notamment l'expression du peptide antifongique Drosomycine (Lemaitre et al., 1996)

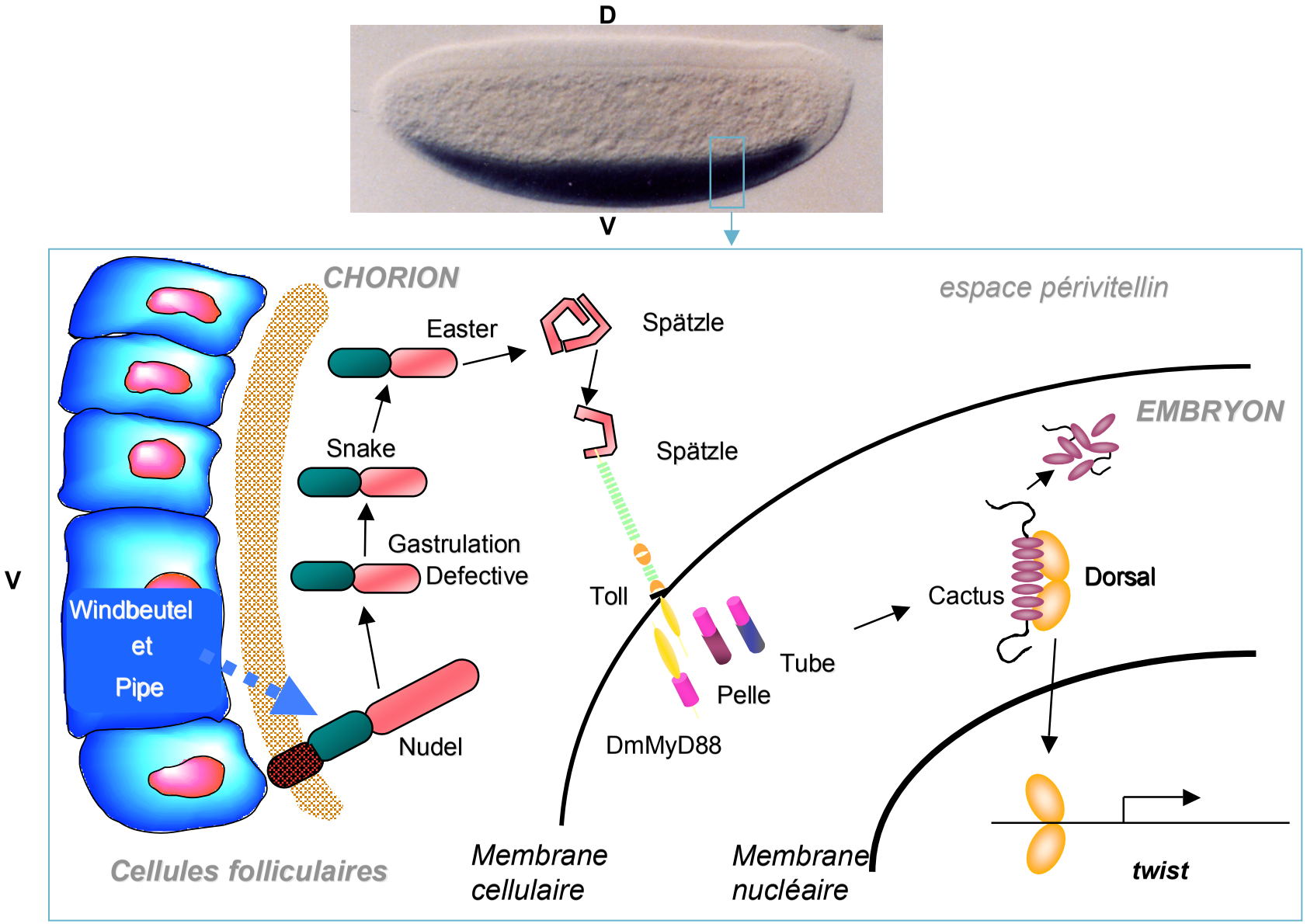


Figure 1. Voie de signalisation de la mise en place de l'axe dorso-ventral de la drosophile. La photo montre un embryon de drosophile après hybridation *in situ* avec une sonde correspondant au gène *twist*. Les protéines Windbeutel et Pipe des cellules folliculaires induisent l'activation de la cascade protéolytique incluant Nudel, Gastrulation Defective, Snake, Easter, qui aboutit au clivage de Spätzle dans l'espace périvitellin et à l'activation de Toll. Toll, par l'intermédiaire de l'adaptateur Tube et de la kinase Pelle, déclenche la phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur Cactus. Le facteur de transcription à domaine Rel, Dorsal, libéré, passe alors dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles, comme *twist*. Le facteur DmMyD88 est décrit dans la partie Résultats de ce manuscrit.

(Figure 2). Les mouches déficientes pour chacun de ces gènes (sauf Cactus qui est un inhibiteur) sont sensibles aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif. En revanche, leur résistance aux infections bactériennes à Gram-négatif n'est pas affectée. De façon surprenante, les gènes situés en amont de Spätzle, codant pour les sérines protéases Nudle, Gastrulation defective, Snake, et Easter ne sont pas impliquées dans la régulation de cette voie d'activation. D'autres protéases sont cependant impliquées dans l'activation de Spätzle, comme le montre la caractérisation des mutants *nec (necrotic)*. Dans ces mutants, la serpine 43Ac n'est pas fonctionnelle, et on observe que (i) Spätzle est constitutivement clivée et (ii) la Drosomycine est exprimée constitutivement en absence d'infection (Levashina et al., 1999). Deux gènes agissant en amont de Spätzle dans la réponse immunitaire, *seml* et *psh*, qui code une protéase, ont récemment été décrits et seront évoqués dans la discussion de ce manuscrit (Michel et al., 2001), (Ligoxygakis et al., 2002a). Des études d'épistasie ont montré que Spätzle agit en amont de Toll.

Toll code un récepteur transmembranaire de type I (Figure 3a). Son ectodomaine est composé de répétitions riches en leucines (LRR) bordées par des motifs riches en cystéines : le motif N-flank (NF) borde les LRRs du côté amino-terminal et le motif C-flank (CF) borde les LRRs du côté carboxy-terminal. Les séquences consensus de ces motifs sont présentées dans la figure 3b. Le domaine intracytoplasmique de Toll est partagé par les membres de la famille du récepteur de l'Interleukine-1 (IL-1R). Ce domaine est aussi présent dans de nombreux gènes de résistance (R) des plantes et est appelé domaine TIR (Toll/IL-1R/R).

Une fois activé, le récepteur Toll s'associe à un complexe qui contient notamment les deux molécules intracytoplasmiques : Tube et Pelle. Je décris dans la partie Résultats de ce manuscrit une troisième molécule du complexe récepteur, DmMyD88. Tube est composé d'un Death Domain (DD), et de cinq répétitions d'un motif octapeptidique (Letsou et al., 1991). Pelle est un homologue de la protéine de mammifères, IRAK (IL-1R associated kinase) composé d'un DD et d'un domaine de sérine-thréonine kinase dans sa partie carboxy-terminale (Shelton and Wasserman, 1993). Le mecanisme de transduction du signal au sein de ce complexe reste à élucider. En effet, Tube ne semble pas interagir directement avec le domaine intracytoplasmique de Toll, au contraire de Pelle qui se lie au domaine TIR de Toll *via* son domaine kinase (Shen and Manley, 1998). Des expériences *in vitro* ont montré que Pelle peut s'autophosphoryler, phosphoryler Tube et le domaine

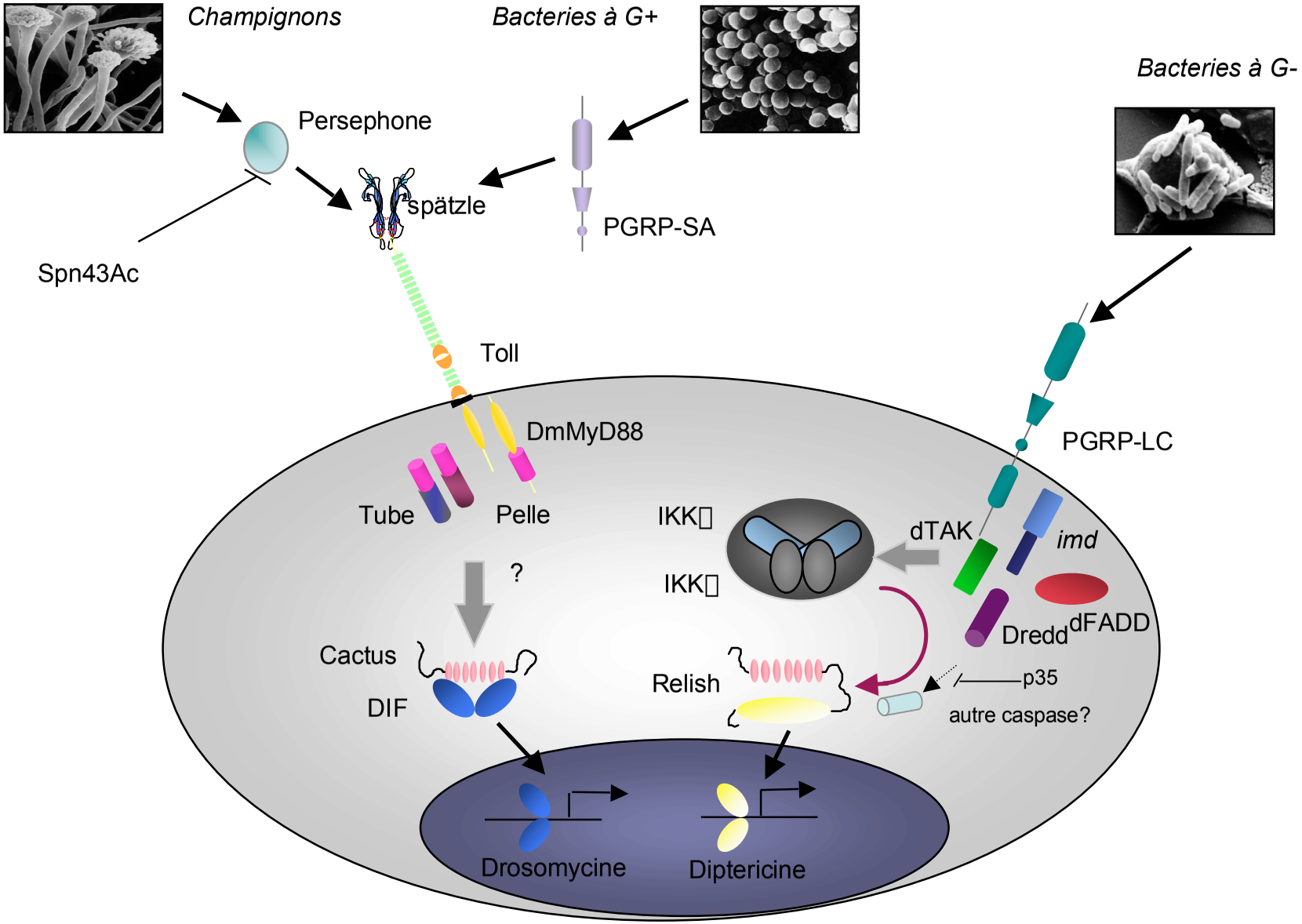


Figure 2. Voies de régulation des peptides antimicrobiens chez la drosophile. La voie Toll induit l'activation de la transcription de la *drosomycine* en réponse à une infection fongique ou bactérienne à Gram-positif. La voie IMD induit la transcription de la *diptéricine* en réponse à une infection par des bactéries à Gram-négatif. Voir le texte pour les détails. Le facteur DmMyD88 est décrit dans la partie Résultats de ce manuscrit.

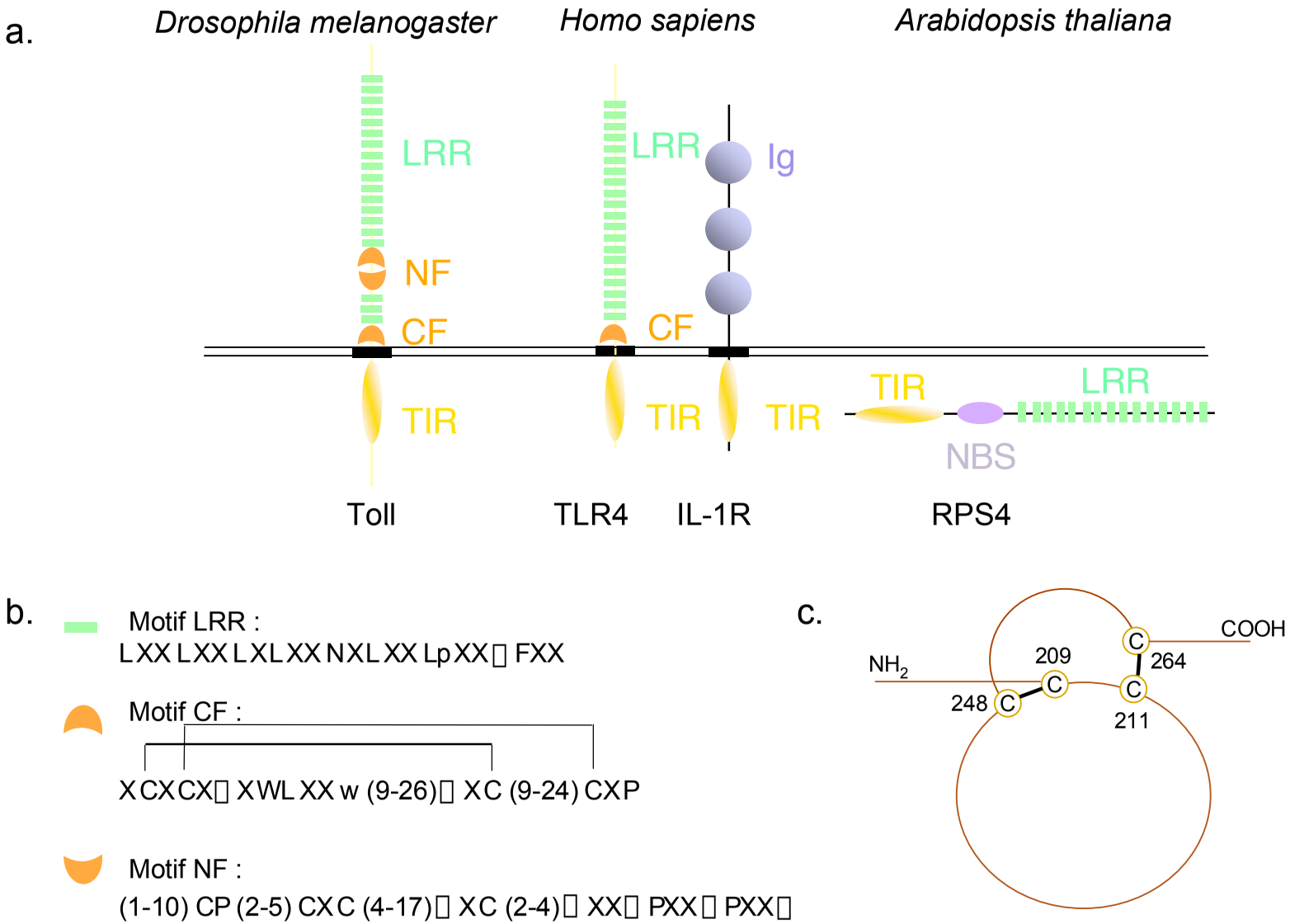


Figure 3. Structure des récepteurs à domaine TIR. a. Comparaison des récepteurs à domaine TIR chez la drosophile (Toll), chez les mammifères (TLR4 et IL-1R) et les plantes (RPS4). TIR : Toll/IL-1R/R, LRR : Leucin Rich Repeats, NF/CF : N/C-flank cystein rich motif, Ig : Immunoglobulin domain, NBS : Nucleotide Binding Site. **b.** Séquences consensus des motifs LRR, NF et CF. : résidu hydrophobe, p : proline, c : cystéine, w : tryptophane, x : acide aminé. Les ponts di-sulfure du motif CF sont indiqués en noir. **c.** Représentation de la structure en double boucle adoptée par le motif CF du récepteur plaquettaire humain GPIb ; ces interactions ont été déterminées expérimentalement.

intracytoplasmique de Toll (Grosshans et al., 1994) (Shen and Manley, 1998). La phosphorylation de Tube semble inhiber le processus d'aggrégation de Tube à la membrane plasmique et pourrait donc appartenir à un mécanisme de régulation négative (Towb et al., 2001). Quant à Pelle, une fois phosphorylée, elle ne peut plus s'associer à Toll (Shen and Manley, 1998). Cette modification pourrait donc permettre à la kinase de se dissocier du récepteur, comme c'est le cas pour son homologue IRAK qui se libère du complexe TLR4/IL-1R par autophosphorylation.

L'activation de ce complexe aboutit à la phosphorylation et à la polyubiquitination de Cactus. Cactus est l'homologue de l'inhibiteur I□B des mammifères, et son mode de dégradation est identique à celui utilisé lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon : Cactus est polyubiquitiné puis dégradé par le protéasome (pour revue (Belvin and Anderson, 1996)).

La dégradation de Cactus permet aux facteurs de transcription de type Rel, Dorsal et Dif (*Drosophila* immunity factor) de passer dans le compartiment nucléaire (Ip et al., 1993) (Lemaitre et al., 1995). Dorsal est requis pour la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon, mais ne semble pas jouer de rôle dans la réponse immunitaire chez l'adulte. En revanche, l'induction de la Drosomycine est abolie dans les mouches déficientes pour *Dif* (Manfruelli et al., 1999) (Meng et al., 1999) (Rutschmann et al., 2000a) (Rutschmann et al., 2002). Chez la larve, Dorsal peut se substituer à Dif et induire l'expression de la Drosomycine, ce qui suggère l'existence de différents cofacteurs requis par les protéines Rel pendant la réponse immunitaire de la larve et de l'adulte chez la drosophile (Petersen et al., 1995). De plus, l'expression de Dorsal est augmentée dans les cellules du corps gras adulte, en réponse à une blessure septique (Lemaitre et al., 1995). Ces données suggèrent que Dorsal pourrait être impliqué dans la régulation d'autres cibles de la voie Toll parmi celles identifiées au cours d'études biochimiques (Uttenweiler-Joseph et al., 1998) ou utilisant des puces à ADN (Irving et al., 2001) (De Gregorio et al., 2001) (De Gregorio et al., 2002b).

Il semble, par ailleurs, que la voie Toll soit impliquée dans le contrôle de la prolifération des hémocytes. En effet, dans un mutant où *Toll* est constitutivement actif, Tl^{1Ob}, on observe une densité d'hémocytes plus de deux fois supérieure à la normale. On observe que plus de 50% de ces cellules sont des lamellocytes, absents dans les larves sauvages saines. Ces lamellocytes encapsulent des tissus du soi et, avec la contribution des cellules à cristaux, forment des tumeurs

mélaniques (Gerttula et al., 1988) (Lemaitre et al., 1995). Le même phénotype est observé dans les mutants déficients pour l'inhibiteur *cactus* (Roth et al., 1991) (Qiu et al., 1998). Par ailleurs, les autres mutants pour les gènes de la voie Toll, *tube* et *pelle* présentent un nombre d'hémocytes réduits dans leur hémolymphe.

La voie Toll semble également contrôler la mélanisation. En effet, le gène codant pour la serpine *27A* qui inhibe la réaction enzymatique de transformation de la mélanisation, est sous le contrôle de la voie Toll (Ligoxygakis et al., 2002b) (De Gregorio et al., 2002a).

III. La voie IMD de la drosophile.

La voie IMD est activée en réponse aux infections bactériennes à Gram-négatif. Elle induit la transcription des gènes codant pour les peptides antibactériens, la Diptéricine, la Cécropine, la Drosocine et l'Attacine. Comme pour la voie Toll, cette transcription requiert une protéine Rel, le facteur de transcription Relish (Figure 2). Cactus n'intervient pas dans l'inhibition de Relish lorsque la voie n'est pas activée car Relish porte ses propres séquences inhibitrices composées de répétitions ankyrines. Relish subit un clivage protéolytique qui permet à son domaine Rel de passer dans le noyau (Dushay et al., 1996) (Stöven et al., 2000). Relish pourrait être clivé par une caspase encore inconnue, en effet, la région qui relie le domaine Rel de Relish aux répétitions ankyrines contient un site de clivage par une caspase (Silverman and Maniatis, 2001). Le fait que l'expression ectopique de l'inhibiteur viral de caspase *p35* abolisse l'inductibilité des gènes codant pour les peptides antibactériens suggère également que des caspases sont impliquées dans la voie (Georgel et al., 2001). La caspase DREDD (death-related ced-3/Nedd2-like protein), requise dans la voie IMD et apparentée à la Caspase-8 des mammifères, ne semble pas cliver Relish directement, mais pourrait activer une caspase intermédiaire (Silverman and Maniatis, 2001), (Elrod-Erickson et al., 2000), (Leulier et al., 2000).

La voie en amont de Relish est composée du signalosome qui regroupe les homologues de la kinase IKK□ (I□B kinase-□) et de la sous-unité régulatrice IKK□ (I□B kinase-□). Les mouches déficientes pour IKK□ et IKK□, *ird5* et *kenny* respectivement sont sensibles à des infections bactériennes à Gram-négatif et sont résistantes aux

infections fongiques et bactériennes à Gram-positif (Lu et al., 2001), (Rutschmann et al., 2000b).

En amont de ce complexe, l'homologue de TAK1 (transforming growth factor-β activated kinase), est aussi requis pour l'induction des peptides antibactériens (Vidal et al., 2001). En amont de dTAK1, *Imd* code une protéine adaptatrice à Death-Domain (DD) qui présente des similarités de séquence avec la protéine RIP (receptor interacting protein) de mammifères (Georgel et al., 2001). RIP sert d'adaptateur entre le récepteur du TNF-α (tumor necrosis factor-α) et le complexe IKK des mammifères (Silverman and Maniatis, 2001). Récemment, l'homologue de FADD (Fas associated death domain protein) qui interagit avec RIP chez les mammifères, dFADD, a été caractérisé chez la drosophile (Naitza et al., 2002) (Leulier et al., 2002). Les mouches déficientes pour dFADD présentent le même phénotype immunitaire que les mutants de la voie IMD. Des études d'épistasie ont montré que dFADD agit en aval de IMD. D'autres études ont montré que dFADD interagit avec DREDD (Hu and Yang, 2000) (Horng and Medzhitov, 2001). IMD, dFADD et DREDD pourraient donc constituer un complexe adaptateur pour le ou les récepteurs de la reconnaissance des bactéries à Gram-négatif.

Enfin, un récepteur de la voie IMD a été identifié récemment, c'est un membre de la famille des PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein), le PGRP-LC. Il sera évoqué plus longuement dans la discussion de ce manuscrit.

En conclusion, la voie IMD est composée par des homologues de molécules impliquées dans la voie IL-1/TLR (TAK-1), dans la voie TNF-α(Caspase-8, RIP, FADD) ou dans les deux (IKKγ, IKKβ, NF-κB). Comme dans le cas de la voie induite par le TNF-α, la voie IMD induit l'activation du facteur de transcription NF-κB, mais également l'apoptose. Comme mentionné ci-dessus, l'expression des peptides antibactériens *via* la voie IMD après infection est bloquée par l'inhibiteur d'apoptose *p35*. De plus, la surexpression de *imd* dans les mouches induit l'apoptose et en particulier l'expression du gène pro-apoptotique *reaper* (Georgel et al., 2001). Ces données s'ajoutent aux similarités entre la voie IMD et la voie du TNF-α.

IV. Les TLRs de mammifères.

La découverte du rôle-clé de Toll dans la réponse immunitaire innée de la drosophile a motivé la recherche de molécules homologues chez les mammifères. Une famille de 10 TLRs (Toll-Like Receptors) a ainsi été identifiée. Comme Toll, les TLR1 à 10 possèdent un domaine TIR (Figure 4). Leurs ectodomaines sont composés de motifs LRR et d'un motif CF, contrairement aux membres de la famille du récepteur de l'IL-1 (IL-1R) qui possèdent également un domaine TIR mais dont l'ectodomaine est composé de trois domaines Immunoglobuline (Figure 3a). Conformément à ces différences structurales, les TLRs et les membres de la famille de l'IL-1R activent des cibles communes en réponse à des ligands différents.

IV. 1. Activation des TLRs.

La première découverte confirmant l'hypothèse selon laquelle les TLRs pouvaient agir en PRRs, est issue du clonage positionnel du locus responsable de l'insensibilité au LPS des souris C3H/HeJ et C57BL/10ScCr. Ce clonage a révélé une mutation inactivant le gène codant pour TLR4 (Poltorak et al., 1998) (Qureshi et al., 1999). La génération de souris, dans lesquelles le gène *tlr4* a été inactivé, a confirmé le fait que TLR4 fait partie du complexe du récepteur du LPS (Hoshino et al., 1999). En conséquence, les souris déficientes pour TLR4 résistent au choc septique induit par le LPS.

De nombreuses études ont ensuite montré que d'autres TLRs jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des PAMPs. Ainsi, TLR2 est impliqué dans la réponse au PGN et aux lipopeptides (Yoshimura et al., 1999) (Takeuchi et al., 2001), TLR3 dans la réponse à l'ARN double-brin viral (Alexopoulou et al., 2001), TLR5 dans la réponse à la flagelline issue des flagelles bactériens (Hayashi et al., 2001) (Gewirtz et al., 2001), et TLR9 dans la réponse aux motifs CpG non méthylés provenant de l'ADN bactérien (Hemmi et al., 2000) (pour revue (Akira and Hemmi, 2003)).

Le répertoire de cette nouvelle famille de PRRs est étendu par le fait que certains TLRs forment des hétérodimères pour reconnaître une plus vaste palette de ligands. Ainsi, TLR2 peut s'associer à TLR1 ou TLR6 pour permettre respectivement la réponse aux lipopeptides triacylés Pam3CSK4 (Takeuchi et al., 2002) et OspA

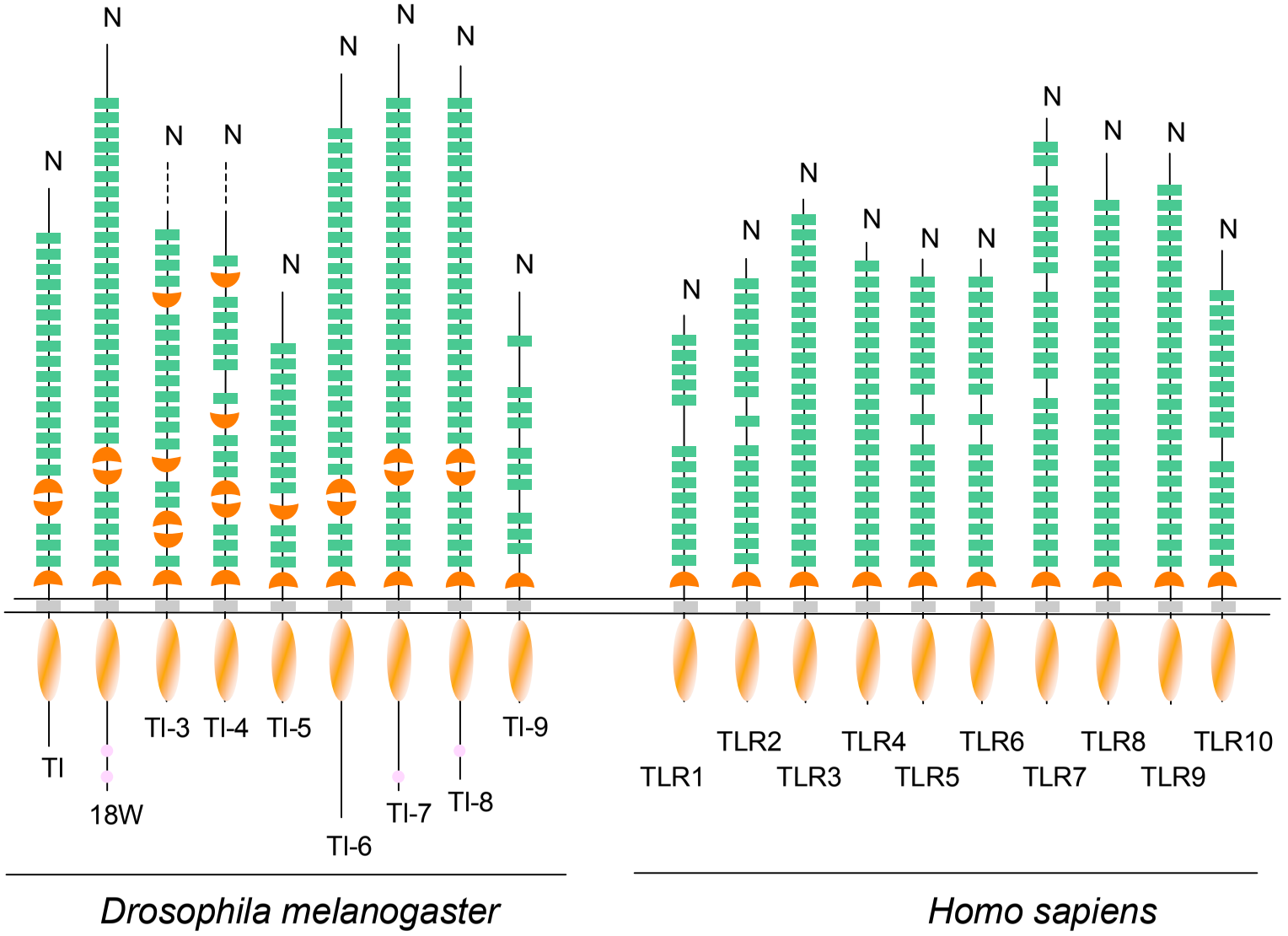


Figure 4. Représentation schématique de la structure des récepteurs Toll chez la drosophile et l'homme. Les motifs riches en leucine (LRR) sont représentés par des rectangles verts, les motifs NF et CF par des demi-cercles oranges, les domaines transmembranaires putatifs par des rectangles gris, le domaine TIR par un ovale jaune, les motifs polyglutamines par des cercles mauves.

(Alexopoulou et al., 2002), ou au lipopeptide diacylé mycobactérien MALP-2 (Takeuchi et al., 2001). D'autres TLRs comme TLR3 et TLR4 peuvent s'associer à des protéines auxiliaires pour la reconnaissance de certains PAMPs. Ainsi TLR4 s'associe à la protéine sécrétée MD-2 et au corécepteur CD14 pour reconnaître le complexe formé par le LPS et la protéine circulante LBP (LPS-binding protein) (Ulevitch and Tobias, 1999). Aucun agoniste issu de microbes n'a été identifié à ce jour pour TLR7 et TLR8, mais il a été montré que ces récepteurs activent une réponse antivirale lorsqu'ils sont stimulés par des composants de faible masse moléculaire de la famille des imidazoquinolines. Ces TLRs pourraient donc être activés par des PAMPs viraux (Hemmi et al., 2002).

De nombreuses études visent actuellement à déterminer si les TLRs interagissent physiquement avec leur ligand. Deux études indépendantes ont utilisé une approche pharmacologique, basée sur l'existence de différences entre les espèces dans la sensibilité à des dérivés du Lipide A, la partie bioactive du LPS : les deux analogues du Lipide A, Lipide IVa et RSLA agissent comme des antagonistes du LPS sur les cellules humaines, et miment les effets du LPS sur des cellules de souris ou de hamster (Poltorak et al., 2000), (Lien et al., 2000). Lorsque l'on introduit un vecteur exprimant TLR4 humain dans les cellules de hamster, on observe que le Lipide IVa et RSLA se comportent comme des antagonistes du LPS, comme sur les cellules humaines. Inversement, la transfection d'un vecteur d'expression pour TLR4 de hamster dans ces cellules humaines rend celles-ci capables d'être activées par le Lipide IVa ou RSLA. TLR4 semble donc capable de reconnaître la différence structurale entre le Lipide A IVa, le lipide A RSLA et le LPS, ce qui suggère fortement que le récepteur doit interagir physiquement avec le LPS. Une étude utilisant du LPS radiomarqué a montré que le LPS interagit avec le complexe récepteur de TLR4 composé de CD14 et MD2 (da Silva Correia et al., 2001). Cependant, ce résultat reste à confirmer puisque la même étude montre une interaction du LPS avec TLR2. Or, les souris déficientes pour TLR2 ont permis de montrer que TLR2 n'est pas impliqué dans la réponse au LPS (Takeuchi et al., 1999). Plus récemment, il a été montré que TLR2 radiomarqué se lie au PGN soluble (Iwaki et al., 2002). La purification de ces PAMPs bactériens est délicate et les risques de contaminations sont importants. Des études indépendantes seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

De façon intéressante, des données montrent que des TLRs pourraient être activés en réponse à des ligands endogènes comme des protéines de choc thermique (Vabulas et al., 2002), des fragments de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes (Johnson et al., 2002), l'acide hyaluronique (Termeer et al., 2002) ou la fibronectine (Okamura et al., 2001). Aucune liaison biochimique directe n'a encore été montrée entre les TLRs et des ligands endogènes, mais ces résultats suggèrent que certains TLRs pourraient être activés, peut-être en synergie, par des molécules dérivées du non-soi et du soi endommagé, permettant au système immunitaire de distinguer entre les microbes commensaux et pathogènes.

IV. 2. Signalisation des TLRs.

Le domaine TIR a un rôle essentiel dans la signalisation par les TLRs. En effet, une mutation ponctuelle dans le domaine TIR de TLR4 de souris (mutation P712H) abolit la réponse au LPS (Poltorak et al., 1998). Ce domaine permet de recruter un adaptateur cytoplasmique à domaine TIR, MyD88. MyD88 active ensuite une voie de signalisation commune aux TLRs et aux récepteurs de la famille IL-1R, qui active les facteurs de transcription NF-□B et AP1 (Figure 5).

L'activation de la voie en aval de MyD88 passe par l'autophosphorylation de la kinase IRAK4, qui se dissocie du complexe récepteur et interagit avec la protéine TRAF6 (Suzuki et al., 2002). Ce facteur active ensuite un hétérodimère composé de deux protéines d'ubiquitination appelées Uev1A et Ubc13 (Deng et al., 2000) (Wang et al., 2001). Ces protéines induisent la polyubiquitination de TRAF6 et permettent ainsi son association à la kinase MAP3, TAK1. Une fois activée, la kinase TAK1 phosphoryle directement les kinases IKK□ et MKK6. IKK□appartient à un grand complexe, dont un des composants essentiels est la sous-unité régulatrice IKK□. IKK□phosphoryle l'inhibiteur cytoplasmique de NF-□B, I□B, permettant ainsi au facteur de transcription de passer dans le noyau et d'activer les promoteurs des gènes cibles. MKK6 phosphoryle la kinase JNK qui conduit à l'activation d'AP-1. AP-1 et NF-□B induisent la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation (cytokines, iNOS, Selectine-E,…) mais également dans la réponse adaptative (CD40, CD80, CD86…).

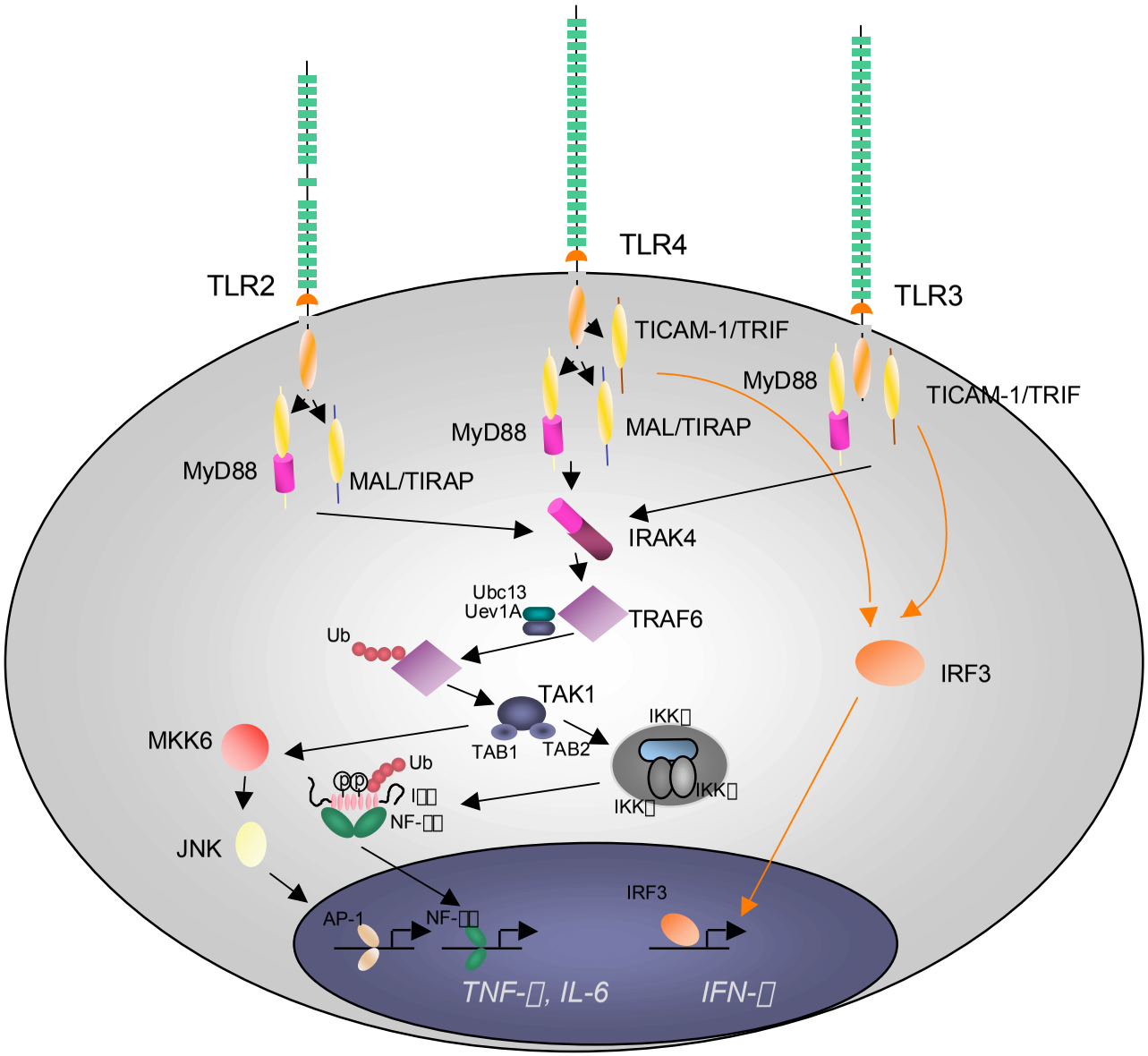


Figure 5. Voies d'activation induites par TLR2, TLR3 et TLR4 chez les mammifères. Voir le texte pour les détails.

Des études récentes ont montré qu'il existe des voies de signalisation indépendantes de MyD88 en aval de TLR3 et TLR4. En effet, dans les souris déficientes pour MyD88, l'induction de NF-κB en réponse au LPS (un activateur de TLR4) ou au dsRNA (un activateur de TLR3) n'est pas abolie mais retardée (Kawai et al., 1999) (Alexopoulou et al., 2001). Pourtant, la maturation des cellules dendritiques des souris MyD88$^{-/-}$ en réponse à ces stimuli (en particulier l'induction de CD-80 et CD86) n'est pas affectée. En outre, TLR3 et TLR4 peuvent activer le facteur de transcription IRF3 et induire la production de la cytokine IFNβ (Interferonβ) indépendamment de MyD88 (Kawai et al., 2001). Par ailleurs, toute réponse aux agonistes de TLR2, TLR5 ou TLR9 est totalement abolie dans ces souris. Ce résultat montre qu'il existe deux groupes de TLRs, dont l'un (TLR3, TLR4) induit des cibles indépendamment de MyD88.

Deux autres adaptateurs, MAL/TIRAP et TICAM-1/TRIF ont été récemment décrits. Des souris déficientes pour MAL/TIRAP ont été générées et il apparaît que MAL/TIRAP constitue un cofacteur de MyD88 dans l'induction de NF-κB et AP-1 en réponse à l'activation de TLR2 et TLR4 (Horng et al., 2002), (Yamamoto et al., 2002a). L'activation de NF-κB et AP-1 ne requiert pas MAL/TIRAP en réponse aux agonistes des autres TLRs. Le second adaptateur, TICAM-1/TRIF a été caractérisé dans des cellules en culture. Ces expériences montrent qu'il est impliqué dans la régulation du promoteur de l'IFNβ par TLR3 et pourrait appartenir à une voie de signalisation indépendante de MyD88 en aval de TLR3 et TLR4 (Oshiumi et al., 2003), (Yamamoto et al., 2002b). Il semble donc que la signalisation initiée par les TLRs soit plus complexe qu'on ne le pensait au départ et reflète sans doute la variété des agonistes reconnus par les TLRs.

IV. 3. TLRs et réponse immunitaire adaptative.

Les TLRs jouent un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative, confirmant ainsi qu'une des fonctions importantes de la réponse innée chez les mammifères est l'activation des lymphocytes. Les cellules dendritiques jouent un rôle-clé dans l'induction de l'immunité adaptative. Elles sont localisées dans les tissus périphériques qui se trouvent aux sites d'entrée potentiels des microorganismes infectieux. Les précurseurs des cellules dendritiques (BMDC :

bone-marrow-derived dendritic cells) expriment les TLRs, qui, en reconnaissant leur ligand, induisent la maturation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques matures expriment les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 et migrent vers les ganglions lymphatiques (Banchereau and Steinman, 1998). Elles présentent alors les peptides provenant du pathogène phagocyté aux lymphocytes T naïfs. La polarisation des lymphocytes T (LT) vers une réponse de type TH1 ou TH2 dépend de plusieurs facteurs et les TLRs semblent y participer. En effet, l'activation des TLRs par les stimuli comme le LPS ou l'ADN CpG dirige les LT vers une réponse de type TH1 en activant la production de la cytokine IL-12 (Akira et al., 2001). L'étude des souris déficientes pour MyD88 montre qu'elles ne développent pas de réponse TH1 quand elles sont immunisées avec un mélange d'ovalbumine (OVA) et d'adjuvant complet de Freund, qui contient notamment des extraits de mycobactéries (Kaisho et al., 2002). Une autre étude plus récente dans un modèle murin de sensibilisation à un antigène inhalé montre que le type de réponse induite, TH1 ou TH2, dépend de la dose de LPS utilisée avec l'antigène : de fortes doses de LPS induisent une réponse TH1, alors que de faibles doses induisent une réponse TH2 . Dans les deux cas, la présence d'un récepteur TLR4 fonctionnel est nécessaire (Eisenbarth et al., 2002).

IV. 4. TLRs et pathologies.

La caractérisation des souris C3H/HeJ a permis de mettre en évidence le rôle clé de TLR4 dans la reconnaissance du LPS et donc dans le choc septique induit par la présence d'endotoxine dans le sang (Poltorak et al., 1998). Parallèlement, l'étude des souris déficientes pour TLR2 a montré qu'elles présentent un développement de la méningite (*Pneumococcal meningitis*) plus sévère que des souris sauvages (Koedel et al., 2003) et une sensibilité accrue à une infection par *Staphylococcus aureus* (Takeuchi et al., 2000).

L'étude du groupe de Bottomly mentionnée ci-dessus, utilisant un modèle murin de sensibilisation allergique à un antigène inhalé, a montré que la signalisation induite par le LPS *via* TLR4 est nécessaire pour induire les réponses TH1 et TH2 et que l'orientation de la réponse dépend de la dose de LPS utilisée : de faibles doses de LPS induisent une réponse TH2 et les fortes doses inhalées induisent une réponse de type TH1(Eisenbarth et al., 2002). Ces données suggèrent que les TLRs

peuvent être impliqués dans des pathologies inflammatoires comme l'asthme (Braun-Fahrlander et al., 2002).

Chez les humains, l'importance des TLRs dans le développement des vaccins a récemment été proposée. L'équipe de Flavell a identifié des patients présentant un titre anormalement faible d'anticorps après une vaccination avec la lipoprotéine de surface OspA de *Borrelia burgdorferi*, l'agent causant la maladie de Lyme. Ces patients exprimaient faiblement TLR1 par rapport aux patients dont le titre en anticorps était normal. L'étude de souris déficientes pour TLR1 a confirmé l'importance de ce récepteur pour la vaccination optimale avec OspA (Alexopoulou et al., 2002).

Par ailleurs, il a été suggéré que les TLRs pourraient être impliqués dans l'autoimmunité. Il a été montré récemment que l'activation des cellules B produisant une classe d'anticorps autoimmuns connus sous le nom de « Rhumatoid Factor », est induite par des complexes Chromatine-IgG. Ces complexes seraient reconnus par l'association d'un récepteur des cellules B (BCR) et d'un TLR, sans doute TLR9 (Leadbetter et al., 2002).

Enfin, la caractérisation de polymorphismes chez des patients humains a permis de montrer que des individus présentant une mutation dans TLR2 semblent être prédisposés à des infections bactériennes (Lorenz et al., 2000). Des mutations dans TLR4 ont été associées à un phénotype de réponse réduite au LPS inhalé (Arbour et al., 2000). Une étude indépendante a également montré qu'un polymorphisme de TLR4 qui atténue la signalisation par ce récepteur est associé à un risque réduit d'athérosclérose (Kiechl et al., 2002).

Comme nous venons de le voir, la découverte de l'importance du récepteur Toll dans la réponse immunitaire innée de la drosophile en 1996 a ouvert un champ très vaste d'investigations chez les mammifères et dans les différents aspects de la réponse immunitaire innée et adaptative. Au vu de l'importance des TLRs dans le contrôle de la réponse innée chez les mammifères, on peut se demander si d'autres récepteurs Toll pourraient intervenir dans les mécanismes de défense de l'hôte chez la drosophile. Je décris dans ce manuscrit la famille des 9 récepteurs Toll de la drosophile. J'ai également identifié et caractérisé la fonction de l'homologue de l'adaptateur MyD88 chez la drosophile. Finalement, je montre que chez la

drosophile, Toll fonctionne comme un récepteur de la cytokine Spätzle, et non comme un PRR.

RESULTATS

Partie I. LA FAMILLE DES RECEPTEURS TOLL CHEZ LA DROSOPHILE

Article 1 : Tauszig S., Jouanguy E., Hoffmann J.A. & ImlerJ.L. **Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 10520-10525 (2000).

I . LA FAMILLE DES RECEPTEURS TOLL CHEZ LA DROSOPHILE

I.1. Identification de 9 récepteurs Toll dans le génome de la drosophile.

I.1.a. Article 1.

Au début de ma thèse, nous avons recherché les molécules apparentées à Toll dans les séquences de *Drosophila melanogaster* disponibles alors : séquences génomiques et banques d'ESTs (Expressed Sequenced Tags). Dans un premier temps, nous avons identifié 6 récepteurs Toll en plus de Toll et 18-Wheeler qui étaient déjà connus. Nous les avons baptisés Toll-3 à –8 et leur étude fait l'objet de l'article 1 présenté ci-dessous. Après soumission du manuscrit pour publication, nous avons identifié un neuvième récepteur Toll (Toll-9). L'étude de ce gène sera décrite dans la partie I.b.

L'article 1 présente une étude comparative des séquences, des profils d'expression et des fonctions des récepteurs Toll. Nous avons étudié les motifs structuraux composant le domaine extracellulaire des Tolls : des motifs riches en Leucines (LRR pour Leucine-rich repeats) sont bordés du côté C- ou N- terminal par des motifs riches en Cystéines (C-flank (CF) ou N-flank (NF) respectivement). L'arrangement de ces motifs diffère entre les différents membres de la famille (Figures 3 et 4). Le domaine intracytoplasmique incluant le domaine TIR est plus fortement conservé entre les Tolls que la partie extracytoplasmique, suggérant que les Tolls peuvent activer des cibles communes en réponse à des ligands différents. Nous avons testé cette hypothèse dans des cellules en culture en utilisant des récepteurs chimériques : les domaines intracytoplasmique et transmembranaire de chacun des Tolls est fusionné à l'ectodomaine de la version constitutivement active de Toll : Toll□LRR (cf article 1, Figure 3. A). Nous avons montré que seuls Toll et Toll-5 sont capables d'induire l'activation du promoteur de la *drosomycine*.

Une de nos hypothèses de travail était qu'un récepteur Toll pouvait être impliqué dans l'activation de la voie IMD et réguler l'expression des peptides antibactériens.

Or, aucun des récepteurs chimériques n'induit l'activation des promoteurs de ces peptides.

Ces résultats suggèrent qu'outre Toll, seul Toll-5 pourrait être impliqué dans le contrôle de l'expression des peptides antimicrobiens. Nous avons ensuite étudié les profils d'expression des récepteurs Toll au cours du développement et après une blessure septique. Les transcrits de Toll-3 et Toll-4 sont difficilement détectables par Northern Blot. Toll en revanche est fortement exprimé et son expression est régulée positivement après blessure septique chez la larve et l'adulte. Par ailleurs, Toll a un profil d'expression présentant des pics au stade embryonnaire et au stade pupal pendant lequel s'effectue la métamorphose. Toll-6, Toll-7 et Toll-8 sont également fortement exprimés à ces deux stades. Ce profil d'expression est celui de gènes impliqués dans le développement et suggère donc plutôt une fonction développementale pour ces membres de la famille. Seul Toll-5 est exprimé plus fortement aux stades larvaire et adulte que durant le développement.

Nous démontrons également dans cette publication qu'une version mutée de la kinase Pelle a un effet négatif dominant et bloque l'induction de la *drosomycine* par Toll et Toll-5, indiquant que Toll-5 active la même voie de transduction que Toll. Pelle est l'homologue de la kinase IRAK-4, qui, chez les mammifères, joue un rôle essentiel dans la réponse au LPS. Nous démontrons que Pelle dominant-négatif ne bloque pas l'induction par le LPS du promoteur du gène codant le peptide antibactérien *attacine*. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse selon laquelle la réponse au LPS implique des mécanismes différents chez les insectes et chez les mammifères, et n'implique pas les Tolls de drosophile.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Servane Tauszig, Emmanuelle Jouanguy, Jules A. Hoffmann, and Jean-Luc Imler

Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*.

PNAS 97 (2000), 10520-10525

Pages 10520-10525 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://intl.pnas.org/cgi/reprint/97/19/10520.pdf

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

I.1.b. Critique du test des récepteurs chimériques .

Après la publication de cet article, il a été montré chez les mammifères que certains TLRs comme TLR2 n'activent NF-□B qu'après hétérodimérisation avec un autre TLR comme TLR1 ou TLR6 (Ozinsky et al., 2000). Nous avons donc testé les différentes combinaisons d'hétérodimérisation des Tolls chimériques et cherché à mettre en évidence l'éventuelle activation du promoteur de la *drosomycine* ou des peptides antibactériens *attacine* et *défensine*. Les résultats sur le promoteur de la *défensine* ont été présentés dans l'article présenté en Annexe I et un exemple de cotransfection de Toll-8 avec les autres Tolls est présenté dans la figure 6. Ces expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence une synergie entre les différents Tolls dans l'activation des promoteurs des peptides antimicrobiens (données non montrées).

I. 2. Toll-9 présente des caractéristiques structurales et fonctionnelles des TLRs de mammifères.

I.2.a. Séquence et structure de Toll-9.

En étudiant les motifs structuraux de la partie extracytoplasmique de Toll-9, nous avons pu observer qu'il se distingue des autres Tolls :

- En effet, alors que les autres membres de la famille présentent au moins un motif riche en cystéines en plus du motif CF qui borde le domaine transmembranaire, Toll-9 n'en présente pas (Figure 4). En cela, il se rapproche également des TLRs qui ne possèdent qu'un motif CF proche de la membrane.
- Contrairement aux autres Tolls, Toll-9 présente deux introns de 50 pb environ à l'intérieur du domaine TIR.
- Il présente un taux d'identité avec les autres Tolls au niveau du domaine TIR qui très inférieur à ceux obtenus lorsqu'on compare les autres membres de la famille entre-eux.

Nous avons alors établi une collaboration avec Olivier Poch à l'IGBMC et procédé à un alignement de séquences des protéines possédant un domaine TIR

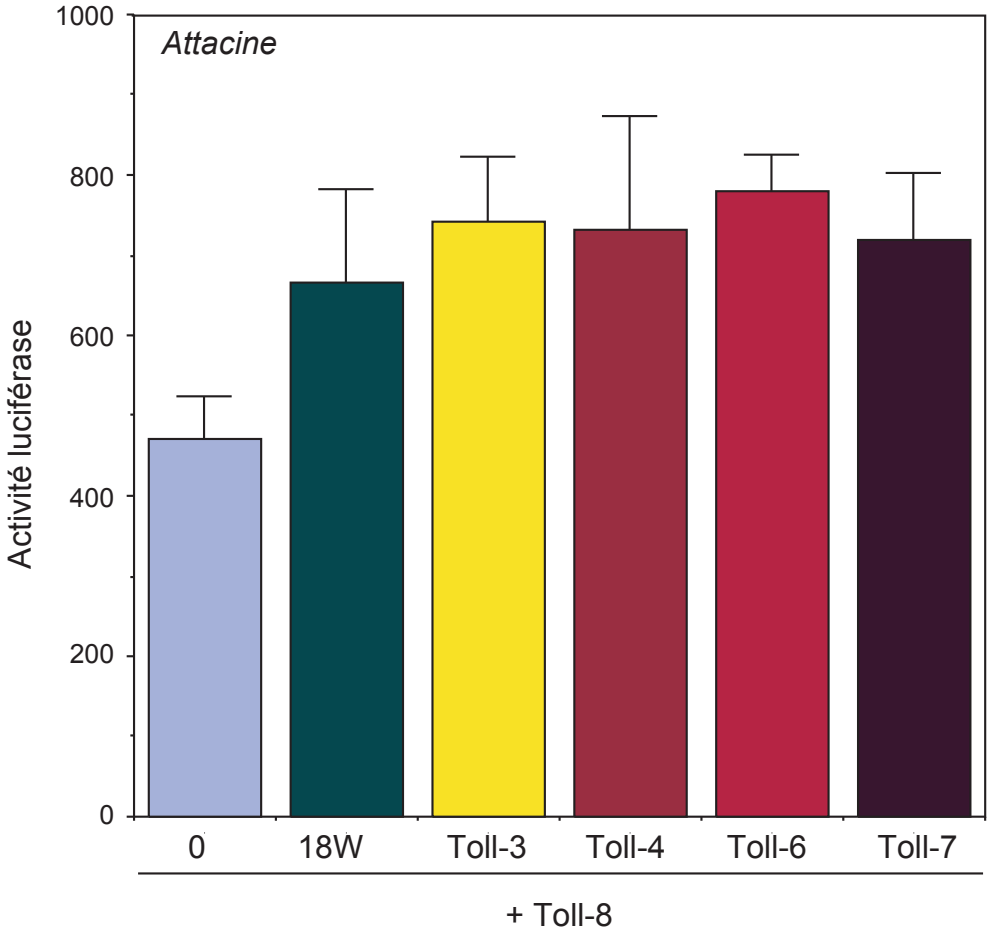


Figure 6. La surexpression dans les cellules S2 de Toll-8 en combinaison avec les autres Tolls n'induit pas de synergie pour l'activation du promoteur de *l'attacine.* Les cellules sont cotransféctées avec la version constitutivement active de Toll8, et soit le vecteur vide (0), soit les autres récepteurs Toll. L'activité luciférase est mesuré à l'aide du gène rapporteur de la luciférase sous contrôle du promoteur de l'attacine. La barre d'erreur est calculée pour deux expériences indépendantes.

dans une centaine d'espèces. Nous avons aligné les 150 acides aminés du domaine TIR (Annexe III). Cet alignement nous a permis de dessiner l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 7. Pour simplifier, nous ne représentons que les protéines à domaine TIR humaines, de drosophile et de la plante *Arabidopsis thaliana*. Cet arbre met en évidence les différentes familles : les protéines de plantes, la famille des récepteurs apparentés au récepteur de l'IL-1, la famille des molécules intracytoplasmiques MyD88, la famille des TLRs et la famille des Tolls de drosophile. De façon surprenante, Toll-9 est plus proche phylogénétiquement des TLRs que des Tolls de drosophile.

I.2.b. Profil d'expression de Toll-9 *au cours du développement de la drosophile.*

Par Northern Blot, nous avons cherché à savoir si *Toll-9* était exprimé aux stade embryonnaire et pupal comme nous l'avions observé pour *Toll*, *18-W*, *Toll-6*, *Toll-7* et *Toll-8*. La figure 8 montre que *Toll-9* est faiblement exprimé dans l'embryon à partir de 6 heures,dans les larves, les pupes, mais plus fortement exprimé dans les adultes mâles et femelles. Cependant, son niveau d'expression reste faible de façon générale puisqu'il faut extraire l'ARNm des différents stades et exposer la membrane hybridée sur un film radiosensible pendant deux semaines pour observer un signal correspondant au transcrit *Toll-9*. La taille du transcrit majeur est de 4,5 kb environ. *Toll-9* a donc un profil d'expression différent de la plupart des récepteurs Toll qui présentent un pic d'expression au cours de l'embryogénèse et de la métamorphose.

I.2.c. Surexpression de Toll-9 dans les cellules S2 en culture.

Il était alors tentant de penser que Toll-9 pouvait fonctionner comme un TLR et contrôler l'expression des peptides antimicrobiens. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant, comme pour les autres Tolls (article 1, fig 3), une version constitutivement active de Toll-9, Toll9□LRR: le domaine transmembranaire et la partie intracytoplasmique de Toll-9 fusionnés au domaine extracellulaire de Toll, sans les motifs LRR (Figure 9a). Nous avons transfecté ce vecteur dans les cellules de Schneider S2 et mesuré l'activité du promoteur des peptides antimicrobiens à l'aide du système de gène rapporteur de la *luciférase*. Toll9□LRR, individuellement ou en combinaison avec les autres Tolls, n'active que faiblement le promoteur de l'*attacine* (Figure 9b et c).

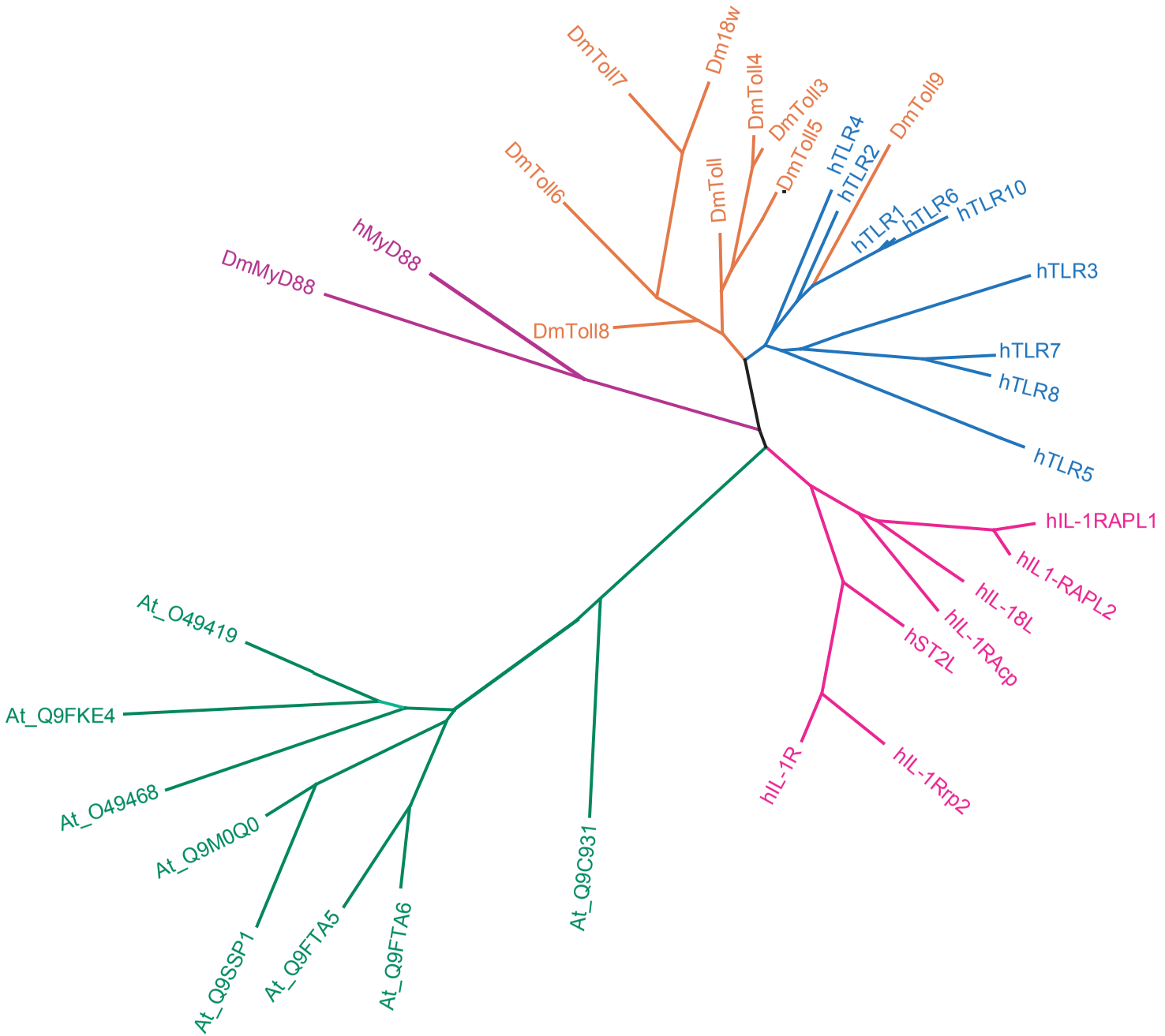


Figure 7. Toll-9 est phylogénétiquement et structuralement plus proche des TLRs que des Tolls. Etude phylogénétique des protéines à domaine TIR chez l'homme, la drosophile et *Arabidopsis thaliana*. L'arbre résulte d'un alignement des domaines TIR (cf annexe III) réalisé sur le logiciel Phylo_win, Neighbor Joining Method (100 espèces, pair gap removal, distance PAM). Les TLRs humains sont représentés en bleu, les Tolls de drosophile en orange, les protéines cytoplasmique MyD88 en violet, les protéines de la famille du récepteur de l'IL-1 en rose et les protéines d'*Arabidopsis thaliana* (At_code de la base de donnée Pfam) en vert.
.

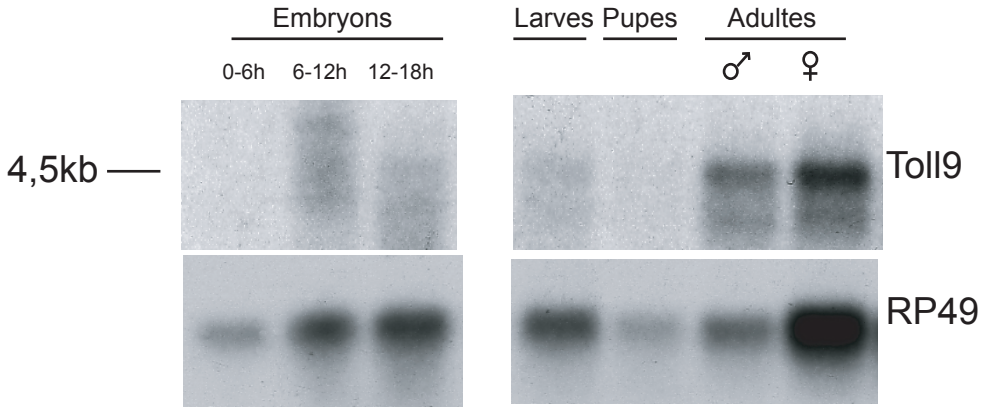


Figure 8. Profil d'expression du transcrit Toll-9 au cours du développement. Les ARN polyA+ ont été extraits à partir d'embryons agés de 0 à 6h, 6 à 12h, 12 à 18h, de larves de pupes et d'adultes mâles et femelles. La taille du transcrit majeur de Toll-9 est indiqué. La sonde RP49 permet de contrôler les dépôts. Pour Toll-9, la membrane hybridée a été exposée deux semaines avec un écran réflecteur. La membrane hybridée avec RP49 est exposée 4 heures.

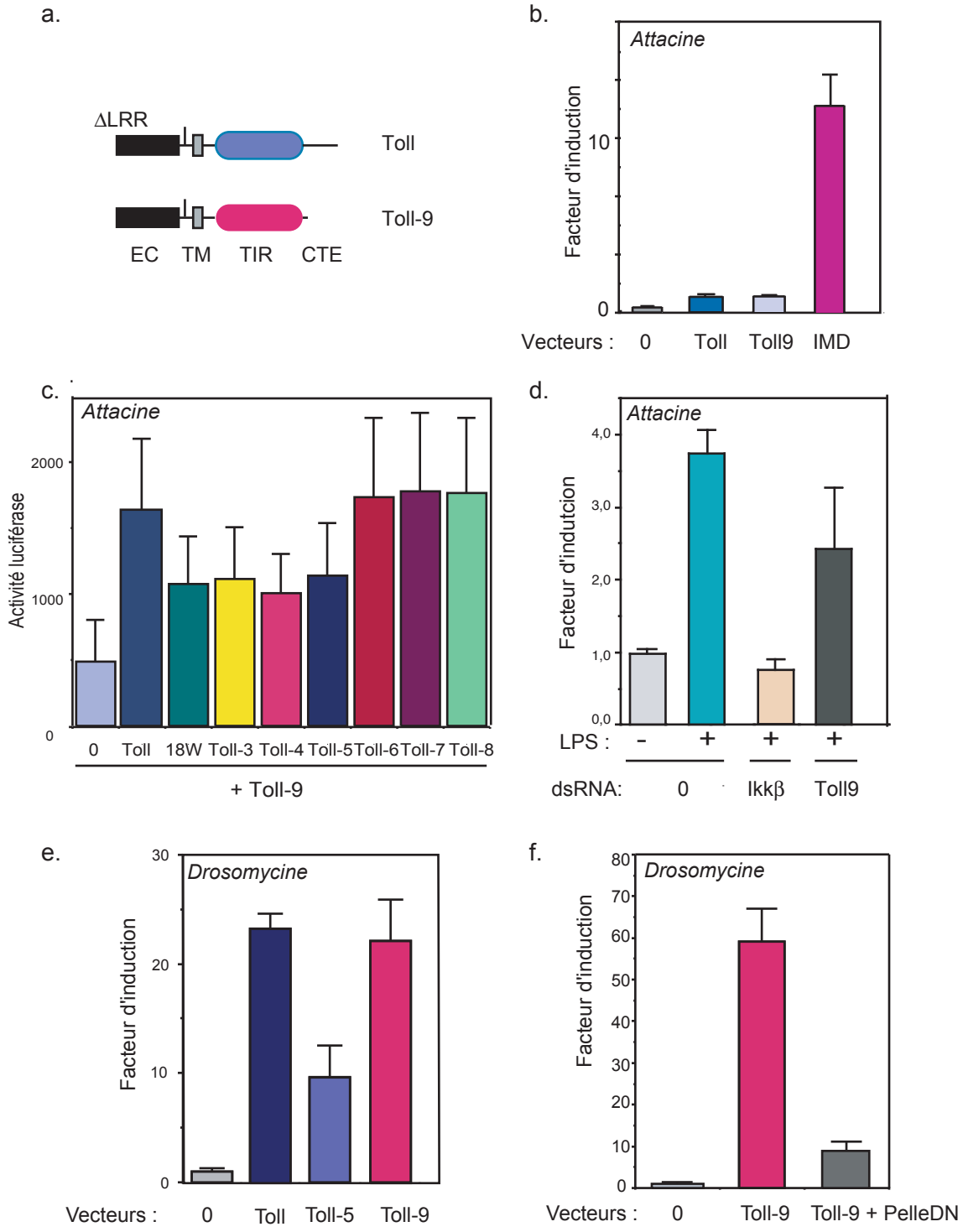


Figure 9. Toll9 n'est pas impliqué dans l'induction du peptide antibactérien Attacine, mais active le promoteur du gène codant le peptide antifongique Drosomycine *via* Pelle. a. Représentation shématique de la construction du récepteur chimérique TollΔLRR-Toll9, EC: ectodomaine, TM : domaine transmembranaire, TIR : domaine TIR, CTE : extension carboxy-terminale. L'ectodomaine de la version constitutivement active de *Toll* est fusionné aux domaines transmembranaire et intracytoplasmique de *Toll-9*. **b.** La transfection du vecteur d'expression vide (0) ou codant pour *Toll* ou *Toll9* n'active pas le promoteur de l'*attacine* dans les cellules S2, contrairement à la surexpression de IMD. L'activation du promoteur de l'*attacine* est quantifiée à l'aide du gène rapporteur *luciférase*. Le facteur d'induction est calculé par rapport à la mesure de l'activité luciférase obtenue après transfection du vecteur vide. **c.** Toll9 n'active que faiblement le promoteur de l'*attacine*, qu'il soit ou non associé avec les autres Tolls. *Toll-9* est cotransfecté avec les différents Tolls et l'activité du gène rapporteur *luciférase* sous contrôle du promoteur *attacine* est mesurée. **d.** Toll9 n'est pas nécessaire à l'activation du promoteur de l'*attacine* par le LPS. Le promoteur de l'attacine est activé dans les cellules S2 stimulées par du LPS (+). La transfection d'ARN double brin (dsRNA) interférant avec la transcription de *ikk*β bloque cette activation, contrairement à la transfection de l'ARN double brin interférant avec la transcription d'un gène contrôle (0) ou de *Toll-9*. **e.** La surexpression de Toll9 active le promoteur de la *drosomycine*. Les cellules S2 sont transfectées avec un vecteur d'expression vide (0) ou codant pour *TollΔLRR, Toll5ΔLRR* ou *Toll9ΔLRR* et le gène rapporteur de la *luciférase* sous contrôle du promoteur de la *drosomycine*. **f.** L'activation du promoteur de la *drosomycine* par la surexpression de Toll9 dépend de Pelle. Les cellules S2 sont transfectées avec le vecteur vide, *Toll9ΔLRR* ou la combinaison de *Toll9ΔLRR* et de la version dominant négative de *pelle* dont le domaine kinase a été muté (PelleDN). Pour d, e et f, le facteur d'induction est calculé par rapport à l'activité luciférase mesurée avec la transfection du vecteur vide.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence, par RT-PCR, l'expression endogène de Toll-9 dans les cellules S2 (données non montrées). Nous avons ensuite montré par la technique d'interférence par ARN double-brin (RNAi), que dans les cellules appauvries en Toll-9, l'activation du promoteur de l'*attacine* après une stimulation au LPS n'est pas affectée (Figure 9d). Dans les cellules déficientes pour le composant de la voie IMD, *ikk*, l'activation du promoteur de l'*attacine* en réponse au LPS est abolie. Toll-9 ne semble donc pas être le récepteur de la voie IMD activé par les infections bactériennes à Gram-négatif.

En revanche, de façon tout à fait intéressante, Toll9LRR active le promoteur de la *drosomycine* avec le même facteur d'induction que TollLRR (Figure 9e et annexe II). Cette activation est bloquée par la version dominant-negative de Pelle : Pelle privée de son domaine kinase.

I.2.d. Surexpression de Toll-9 in vivo*.*

Nous avons confirmé ces résultats en surexprimant le gène Toll-9 de façon ectopique dans les mouches transgéniques : le cDNA de Toll9LRR est introduit sous contrôle d'un multimère du motif UAS_{Gal4} de la levure (Brand and Perrimon, 1993). Pour l'expérience, ces mouches transgéniques sont croisées avec une souche exprimant le gène *Gal4* de levure sous contrôle du promoteur du gène *yolk (yp1 : yolk protein 1)*. Yolk est une protéine majeure du vitellus, la protéine Gal4 n'est alors exprimée que dans les cellules du corps gras des femelles. Dans ces cellules, Gal4 active la transcription du transgène Toll9LRR. Les mâles servent de contrôle négatif (le promoteur *yolk* y est inactif). La figure 10a montre que la surexpression d'une version constitutivement active de Toll-9 dans le corps gras des femelles induit l'expression constitutive de la Drosomycine à un niveau semblable à celui observé après une infection avec un mélange de bactéries à Gram-positif et négatif. L'expression constitutive de la Drosomycine (et à un moindre degré de la Metchnikowine) a également été observée dans les mouches dont le gène *cactus* est muté et dans les mouches qui expriment la version gain-de-fonction de Toll, $Toll^{10B}$. Dans notre expérience, on observe également une expression constitutive de la Metchnikowine, de l'Attacine et de la Drosocine. Cette expression est cependant moins forte que celle obtenue après blessure septique. La surexpression de

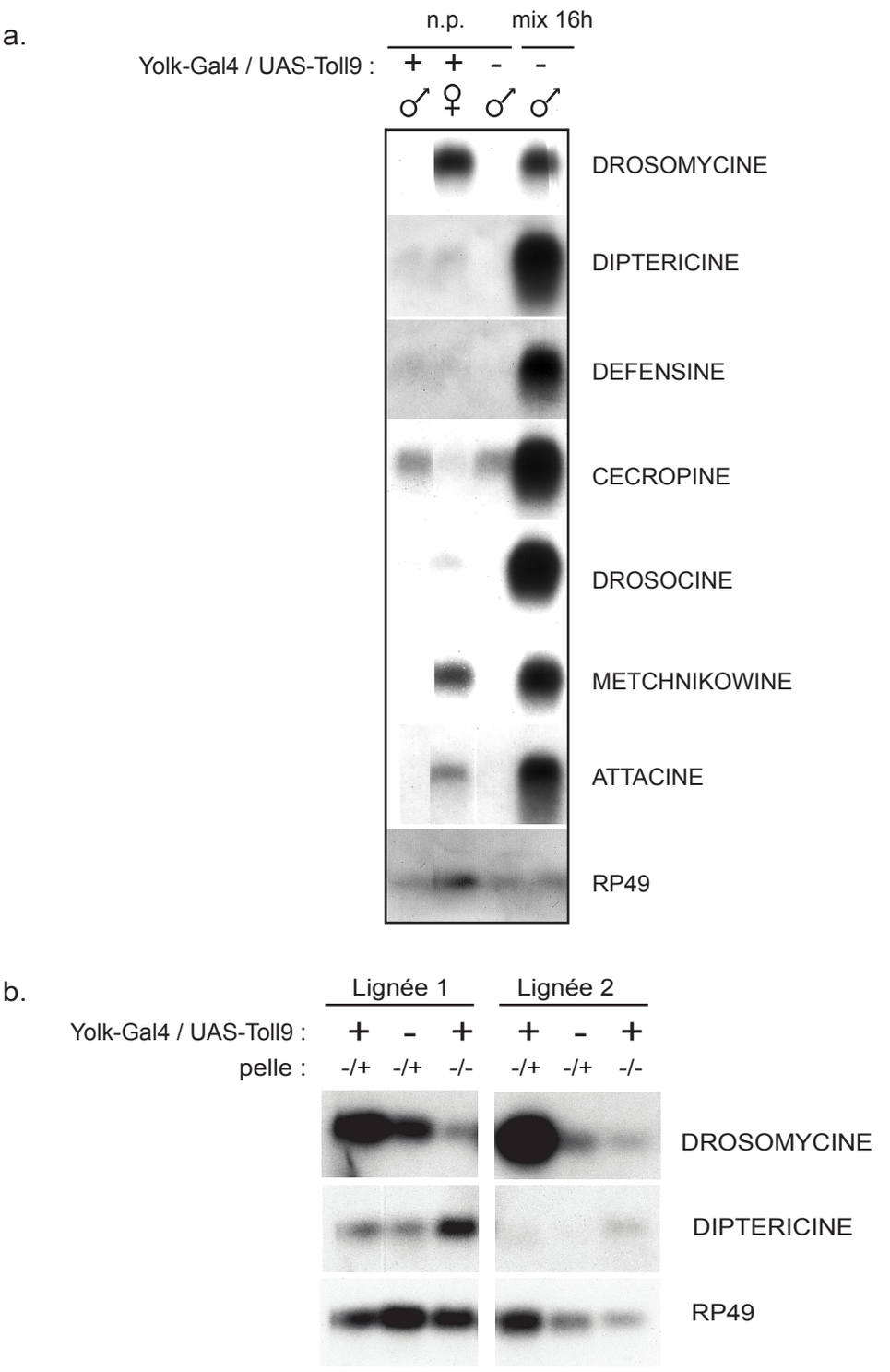


Figure 10. La surexpression de Toll-9 *in vivo* induit l'expression constitutive de la Drosomycine via Pelle. a. Les mouches portant le transgène *UAS-Toll9ΔLRR* sont croisées à des mouches portant le driver *ylk-Gal4*, qui est spécifiquement actif dans les cellules du corps gras des femelles. Les mâles servent donc de contrôle négatif dans cette expérience (-). Les mouches portant à la fois le transgène et le driver sont collectées sans avoir été infectés (n.p.), les mâles et les femelles sont séparés, leurs ARN totaux sont extraits et analysés par Western Blot. En contrôle positif, des mâles sauvages (-) ont été collectés 16h après avoir été piqués avec un mélange de bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif (mix16 h : *E.coli* + *M.luteus*). **b.** L'expression constitutive de la Drosomycine induite par la surexpession ectopique de Toll-9 est dépendante de Pelle. Deux lignées indépendantes ont été générées, portant le transgène *UAS-Toll9ΔLRR*(+) ou non (-), le driver *ylk-Gal4* et un allèle mutant de Pelle de façon hétérozygote (-/+ : pll^{078}/+ ou pll^{rm8}/+) ou trans-hétérozygote (-/- : pll^{078}/pll^{rm8}). Les ARNs totaux des femelles sont collectés et analysés par Northern Blot. Pour a et b, les sondes hybridées sont indiquées à droite. RP49 permet de contrôler la quantité d'ARN déposée dans chaque puit.

Toll9□LRR n'induit pas l'expression des peptides Diptéricine, Défensine et Cecropine.

Afin de vérifier que cette activation requiert la voie Toll, comme nous l'avons observé dans les cellules S2, nous avons procédé à une expérience d'épistasie. Nous avons croisé les mouches de deux lignées indépendantes exprimant le transgène *UAS-TOll9□LRR* sous contrôle du driver *yolk-Gal4* avec des mouches déficientes pour la kinase Pelle. La figure 10b montre que les mouches issues de ce croisement n'expriment plus la Drosomycine constitutivement.

Nous avons donc confirmé les résultats obtenus *in vitro*, Toll9□LRR induit une expression constitutive de la Drosomycine *via* la voie Toll. Les séquences des domaines TIR de Toll et Toll-9 sont éloignées, mais ces deux récepteurs sont capables d'activer une même voie de transduction conduisant à la transcription des gènes *drosomycine* et *metchnikowine*.

En conclusion, nous avons identifié une famille de récepteurs Toll de taille identique à la famille des TLRs chez les mammifères. La fonction de Toll-9 dans la réponse immunitaire reste à clarifier, mais il apparaît qu'hormis Toll, Toll-5 et Toll-9, les membres de la famille semblent avoir une fonction plutôt développementale qu'immunitaire. Les données de phylogénie montrant que les Tolls de drosophile présentent plus de similarités entre eux qu'avec les TLRs et l'exception présentée par Toll-9, phylogénétiquement plus proche des TLRs que des Tolls de drosophile seront abordées dans la discussion de ce manuscrit.

Partie II. DmMyD88, un nouveau composant de la voie Toll.

Article 2 : **Tauszig-Delamasure S., Bilak H., Capovilla M., Hoffmann, J.A. & Imler, J.L.** Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. ***Nature Immunol.*, 3, 91-97 (2002).**

Partie II . DmMyD88, un nouveau composant de la voie Toll.

II.1. DmMyD88 appartient à la voie Toll et est impliqué dans la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif.

II.1.a. Article 2.

Nous avons décrit un nouveau composant de la voie Toll, nécessaire à l'expression de la Drosomycine à la fois dans les cellules de la lignée S2 et dans les mouches. Par des expériences de RNAi dans les cellules et d'épistasie dans les mouches, nous avons montré que DmMyD88 est activé dans la voie Toll en aval de Toll et en amont de Tube et Pelle. Les résultats obtenus par des expériences d'immunoprécipitation dans les cellules confirment ces données puisqu'ils montrent que DmMyD88 interagit avec Toll et Pelle.

Dans cet article, nous avons présenté le phénotype immunitaire de la lignée EP(2)2133 dans laquelle un transposon est inséré dans la région non codante du premier exon de *DmMyD88* (Figure 11a), causant une forte réduction de l'expression du gène. Les mouches homozygotes pour cette insertion présentent le même phénotype immunitaire que les mutants de la voie Toll : elles sont sensibles aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif et n'expriment plus la Drosomycine en réponse à ces infections. Dans la figure 5 de l'article, nous avons démontré que l'expression de la Drosomycine est également affectée dans des mouches trans-hétérozygotes pour l'insertion EP(2)2133 et pour la déficience Df4966 qui découvre le gène *DmMyD88*. Elle est rétablie dans les mouches hétérozygotes pour l'insertion EP(2)2133 et la déficience Df5423 qui ne découvre pas *DmMyD88*. D'autre part, nous avons établi une lignée de mouches dans laquelle le transposon a été remobilisé afin d'introduire une excision exacte. Dans ces mouches, l'expression de la Drosomycine est normale après infection. Ces expériences nous ont permis d'affirmer que le phénotype immunitaire observé est bien dû à l'expression réduite de

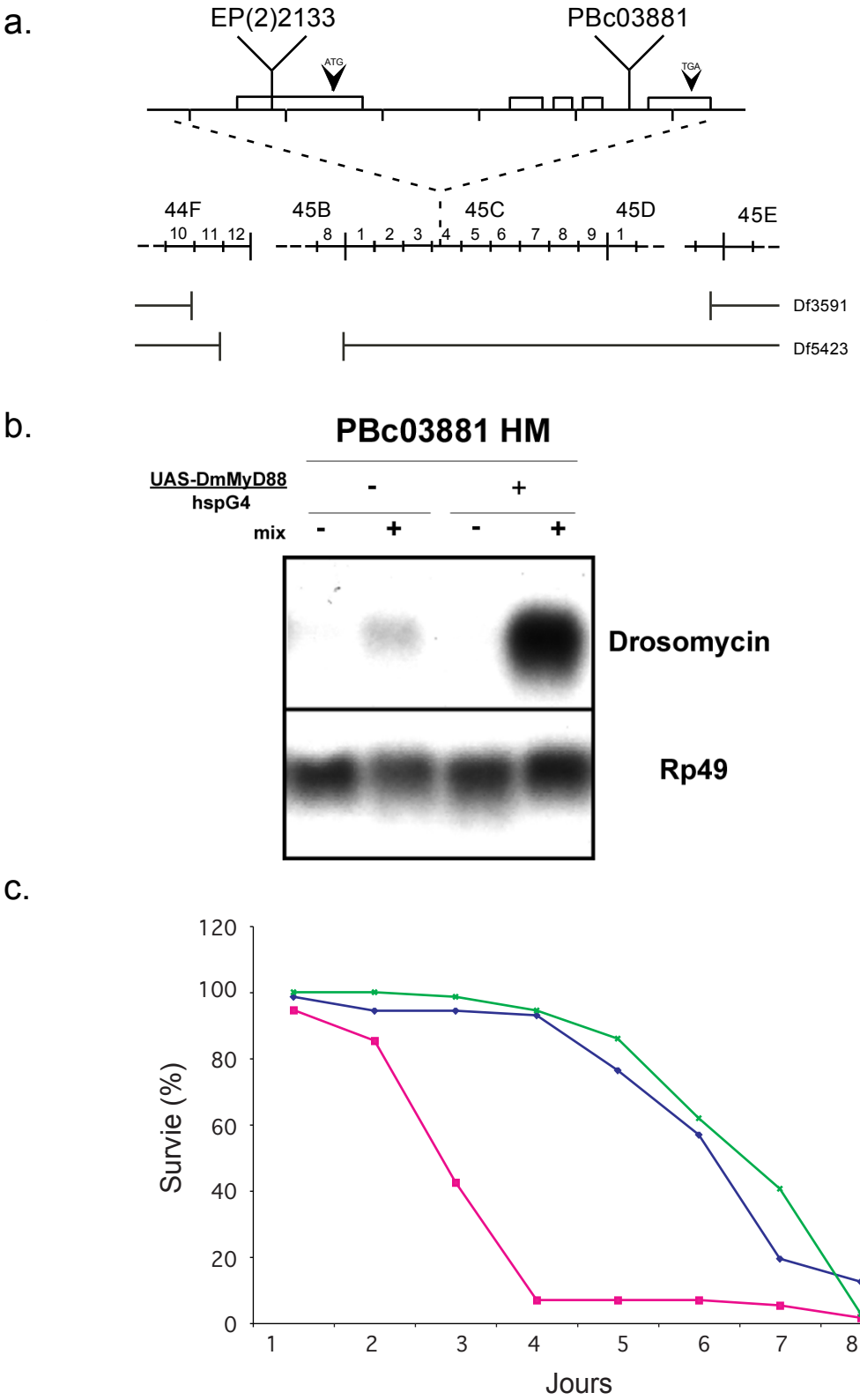


Figure 11. L'expression ectopique du trangène *UAS-DmMyD88* dans la lignée PBc03881, dans laquelle la transcription de *DmMyD88* est affectée, restaure la résistance aux infections fongiques. a. Structure et position cytologique du gène *DmMyD88*. Les rectangles blancs représentent les exons. Le site d'insertion des transposons EP(2)2133 et PBc03881 et les déficiences Df3591 et Df5423 sont indiqués. **b.** L'expression ectopique du transgène *UAS-DmMyD88* sous contrôle du driver *hspGal4* dans la lignée PBc03881 permet de restaurer le phénotype immunitaire, au niveau de l'induction de l'expression de la Drosomycine en réponse à une piqûre septique. Les ARNs de mouches sont extraits 48h après (+) ou sans (-) piqûre septique (mélange *E.coli* et *M.luteus*). Les sondes hybridées sont indiquées, RP49 est une protéine ribosomale qui permet de contrôler la quantité d'ARN chargée. HM : homozygote. **c.** Les mouches ont été infectées naturellement par des spores de *Beauveria bassiana* puis placées à 29°C. Les mouches vivantes sont comptées quotidiennement pour déterminer le pourcentage de survie. Les homozygotes pour l'insertion PBc03881 sont représentés en rose, les hétérozygotes ont été utilisés en contrôle sauvage (bleu). Le phénotype de susceptibilité aux infections fongiques est sauvé par l'expression du transgène *UAS-DmMyD88* sous contrôle du driver *hspGal4* dans la lignée PBc03881 (vert).

DmMyD88 dans les mouches EP(2)2133 et d'exclure l'hypothèse d'une seconde mutation dans le génome, en dehors du locus de *DmMyD88*.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Servane Tauszig, Hana Bilak, Maria Capovilla, Jules A. Hoffmann, and Jean-Luc Imler

Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections.

Nature Immunology 3 (2002), 91-97

Pages 91-97 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ni/journal/v3/n1/full/ni747_fs.html&content_filetype=pdf

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

II.1.b. Sauvetage du phénotype immunitaire de la lignée PBc03881 déficiente pour DmMyD88*.*

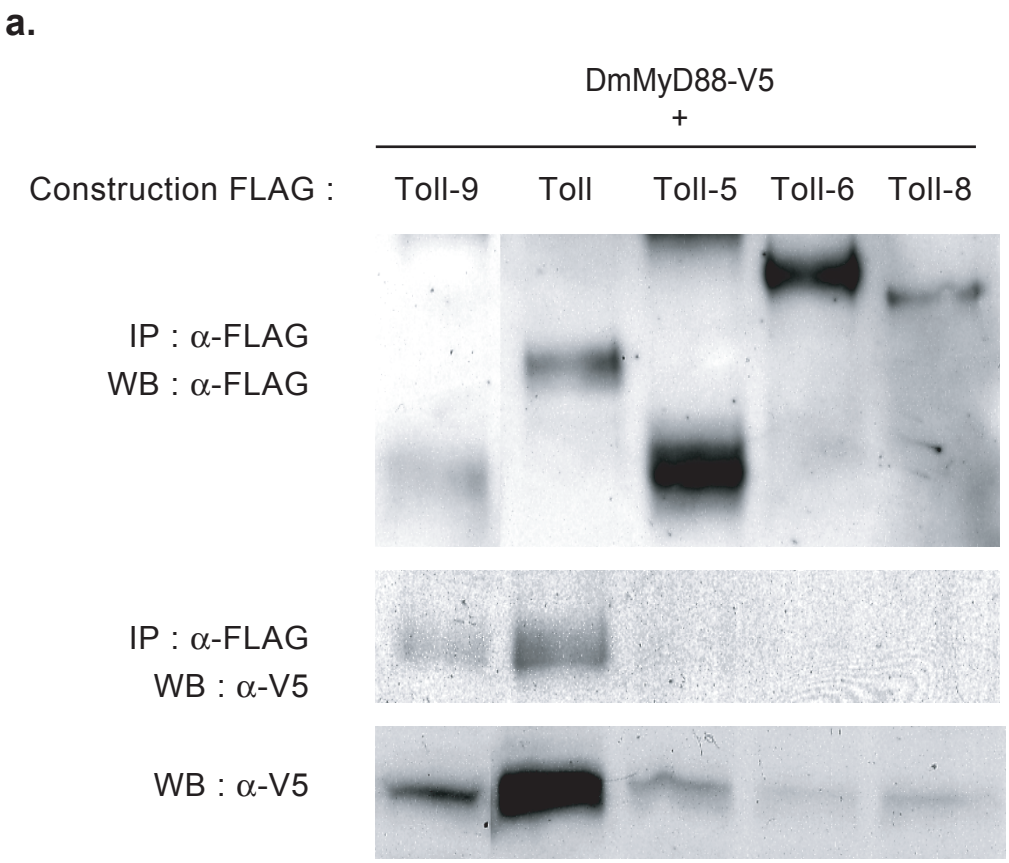
Après publication de cet article, nous avons reçu la lignée PBc03881 générée par la compagnie Exelixis à San Francisco, dans laquelle un transposon est inséré dans le dernier intron de *DmMyD88* (Figure 11a). Le niveau du transcrit *DmMyD88* n'est pas réduit dans ces mouches, mais des expériences de RT-PCR ont montré que l'insertion PBc03881 interfère avec l'épissage du transcrit *DmMyD88* : le dernier exon de *DmMyD88* est remplacé par les exons 2, 3 et 4 du gène *white*. Ce transcrit chimérique code une protéine tronquée dans laquelle l'extension C-terminale est remplacée par 29 acides aminés.

Une étude a été menée au laboratoire sur cette lignée pour étudier le rôle de *DmMyD88* dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon (Kambris et al., 2003). Dans le cadre de cette étude, nous avons montré que la lignée PBc03881 présente le même phénotype immunitaire que la lignée EP(2)2133. Nous avons établi une lignée surexprimant le trangène *UAS-DmMyD88*, sous contrôle du driver *hsp-Gal4,* et portant l'insertion PBc03881. L'expression du transgène permet de restaurer l'induction de la Drosomycine après infection et rend les mouches résistantes aux infection fongiques et bactériennes à Gram-positif (Figure 11b et c).

I.2. DmMyD88 est aussi nécessaire en aval de Toll-5 et Toll-9.

I.2.a. DmMyD88 interagit avec Toll-9 dans les cellules S2.

Nous avons mis en évidence une interaction entre DmMyD88 et Toll9□LRR grâce à des constructions marquées respectivement par les étiquettes V5 et Flag (Figure 12a). Comme dans le cas de la cotransfection Toll□LRR-Flag / DmMyD88-V5, nous observons dans chaque expérience réalisée que l'expression de DmMyD88 est stabilisée, probablement par la formation du complexe DmMyD88/Toll-9(Figure 12b) .



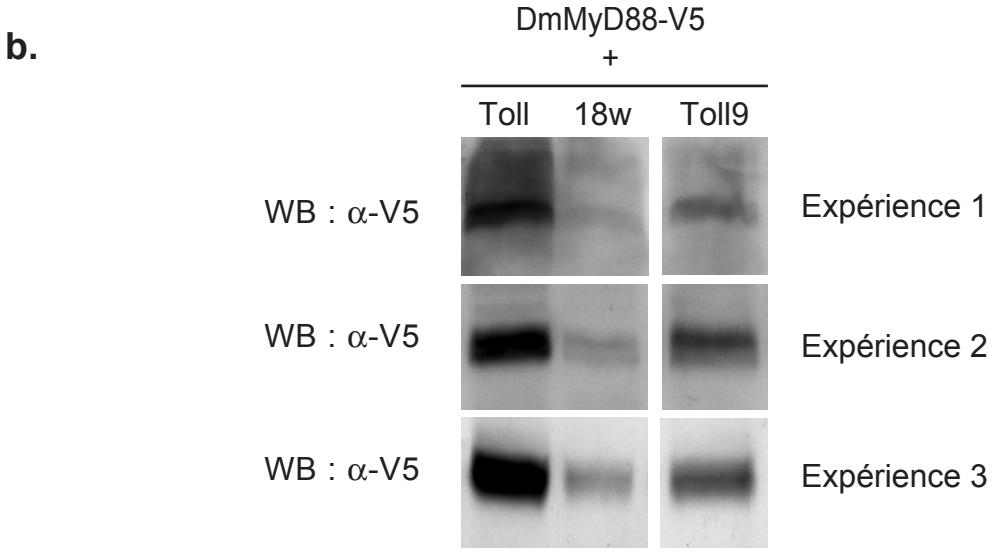


Figure 12. DmMyD88 interagit spécifiquement avec Toll et Toll-9. a. DmMyD88 coimmunoprécipite avec Toll et Toll-9 mais avec aucun des autres membres de la famille dans les cellules S2. Les cellules sont transfectées avec un vecteur d'expression codant DmMyD88-V5 et, soit le vecteur codant la version constitutivement active TollΔLRR-Flag, soit les constructions chimériques composées de l'ectodomaine de TollΔLRR-Flag fusionné au domaine intracytoplasmique de Toll-5, -6, et -8. Les cellules sont immunoprécipitées (IP) avec un anticorps monoclonal anti-Flag, et analysées par immunoblot avec un anticorps anti-V5 ou anti-Flag (WB). Un aliquot de l'extrait cellulaire avant immunoprécipitation est analysé par immunoblot avec un anticorps anti-V5 (WB). **b.** Comparaison de l'expression de DmMyD88 détectée dans l'aliquot de l'extrait cellulaire, avant immunoprécipitation, analysé par immunoblot avec un anticorps anti-V5 pour les cellules transfectées avec DmMyD88 et Toll, 18w ou Toll-9. Les résultats de trois expériences de transfection indépendantes sont montrés.

I.2.b. Une version dominant-négative de DmMyD88 inhibe l'activation du promoteur de la drosomycine *par Toll5ΔLRR et Toll9ΔLRR dans les cellules S2.*

Afin de vérifier si l'activation du promoteur de la *drosomycine* par Toll5ΔLRR et Toll9ΔLRR passe par DmMyD88, nous avons utilisé le vecteur exprimant la version dominant-négative de DmMyD88 (DmMyD88-DD), composée uniquement de son Death-Domain. Dans la figure 13, nous montrons que DmMyD88-DD inhibe l'activation constitutive du promoteur de la *drosomycine* par la surexpression de TollΔLRR, Toll5ΔLRR et Toll9ΔLRR (voir aussi annexe II).

La protéine DmMyD88 est donc nécessaire à l'activation du promoteur de la *drosomycine* par ces trois récepteurs. Or nous avons montré que seulement deux d'entre eux, Toll et Toll-9 interagissent avec DmMyD88. Ce résultat surprenant s'explique

- soit par le fait que Toll-5 et DmMyD88 interagissent mais que nos expériences d'immunoprécipitation n'ont pas permis de détecter cette interaction,
- soit par le fait que Toll-5 et DmMyD88 s'associent indirectement : Toll-5 pourrait par exemple s'associer à Toll , dont le domaine TIR se lie à DmMyD88.

En conclusion, nous avons identifié un nouveau composant de la voie Toll. Des études récentes montrent que DmMyD88 est également impliqué dans la détermination de l'axe dorso-ventral par Toll chez l'embryon de drosophile (Kambris et al., 2003), (Charatsi et al., 2003). DmMyD88 n'est pas suffisant pour activer directement l'homologue de IRAK, Pelle, et agit en amont de l'adaptateur à Death Domain Tube. Cette dernière molécule s'apparente donc fonctionnellement à l'adaptateur à domaine TIR TIRAP, qui est un cofacteur essentiel de MyD88 en aval de TLR2 et TLR4 chez les mammifères. Nos résultats montrent clairement que chez la drosophile, DmMyD88 n'est pas impliqué dans la réponse aux bactéries à Gram négatif, contrairement à ce qu'on observe chez les mammifères. DmMyD88 interagit cependant avec Toll-9, confirmant ainsi l'homologie entre Toll-9 et les TLRs de mammifères mise en évidence par les données de séquences présentées dans la première partie des résultats.

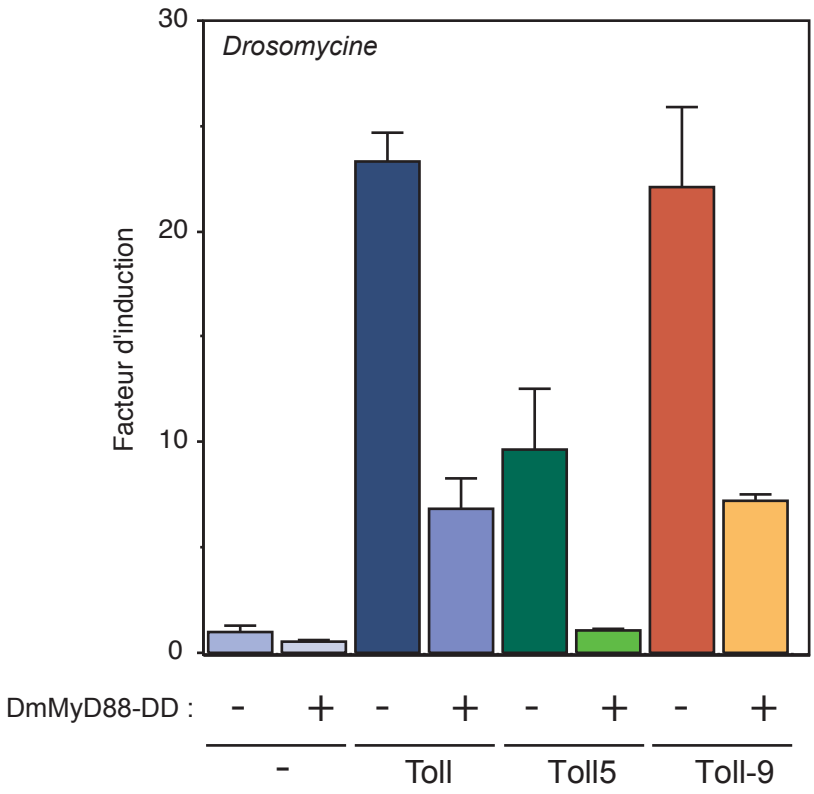


Figure 13. Toll, Toll-5 et Toll-9 induisent l'activation du promoteur de la drosomycine *via* DmMyD88 dans les cellules S2. Les cellules S2 ont été transfectées avec un vecteur d'expression vide (-) ou codant pour les versions constitutivement actives Toll, Toll-5 ou Toll-9. La version dominant négative de MyD88 (Death Domain seul) est cotransfectée (+) ou non (-) et l'activation du promoteur de la *drosomycine* est quantifiée à l'aide du gène rapporteur de la *luciférase*. La barre d'erreur est calculée pour deux expériences indépendantes.

Partie III. Toll fonctionne comme un récepteur de cytokine.

Article 3: Weber A.N.*, Tauszig-Delamasure S.*, Hoffmann J.A., Lelièvre E., Gascan H., Ray K.P., Morse M.A., Imler J.L. and Gay N.J. **The interaction of the proteolytically cleaved cytokine Spätzle with Toll is direct and sufficient to establish signaling.** (* contribution équivalente). Soumis.

III. Toll fonctionne comme un récepteur de cytokine.

III.1. Article 3.

Des études génétiques ont montré que l'activation de Toll nécessite le clivage protéolytique de Spätzle (Morisato and Anderson, 1994), (Levashina et al., 1999), cependant aucun mécanisme biochimique d'induction des Tolls et des TLRs n'a clairement été élucidé à ce jour. Nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Nick Gay à Cambridge qui a purifié le précurseur (SpzFL) et le fragment actif de Spätzle obtenu après clivage (SpzC106). Nous disposons d'un test fonctionnel pour Spätzle dans les cellules S2. En effet, nous pouvons vérifier l'activité de SpzC106 sur l'activation du promoteur de la *drosomycine* régulant le gène rapporteur *luciférase*. Contrairement à SpzFL, SpzC106 active le promoteur de la *drosomycine,* de façon saturable et dose-dépendante avec une EC50 =0,5 nM. Par des expériences de compétition, nous avons montré que SpzFL doit être clivé pour se fixer à Toll. De plus, la technique de RNAi mise au point dans ces cellules a permis de montrer que cette activation se fait *via* le récepteur Toll. Les cellules S2 nous ont également permis de vérifier que la protéine recombinante SpzC106 reste fonctionnelle après avoir subit une iodination. Nous avons ainsi pu procéder aux expériences de Scatchard et de crosslink qui ont montré qu'un dimère de SpzC106 se lie à un dimère de Toll à la surface des cellules S2 avec un KD=0,4 nM.

De façon intéressante, nous avons pu montrer que ces protéines recombinantes sont également fonctionnelles *in vivo*. En effet, l'injection dans les mouches de Spz106 induit l'expression de la Drosomycine en absence d'infection, alors que SpzFL reste inactif. Une injection de SpzC106 restaure l'expression de la Drosomycine dans les mouches déficientes pour Spätzle. En revanche, l'induction de l'expression de la Drosomycine est bloquée dans les mouches déficientes pour Toll après injection de SpzC106. Par ailleurs, nous avons vérifié que le précurseur recombinant SpzFL pouvait être reconnu et clivé en réponse à une infection. Son injection dans les mouches déficientes pour Spätzle restaure l'induction de la Drosomycine, après une infection fongique ou bactérienne à Gram-positif qui active

la cascade de protéases en amont du clivage de SpzFL. Nous avons également pu montrer que Spätzle circule dans l'hémolymphe, puisqu'en transférant l'hémolymphe de mouches sauvages dans des mouches déficientes pour Spätzle, on restaure également l'activation de la voie Toll après infection.

Des expériences *in vitro* réalisée à Cambridge par l'équipe de N. Gay, utilisant les techniques de Surface Plasmon Resonance (Biacore), et d'Isothermal Titration Calorimetry (ITC) ont confirmé ces résultats : deux monomères de Toll fixent un dimère de SpzC106.

The interaction of the proteolytically cleaved cytokine Spätzle with Toll is direct and sufficient to establish signaling.

Alexander NR Weber[§‡&], Servane Tauszig-Delamasure[#&], Jules A. Hoffmann[#], Eric Lelièvre[+], Hugues Gascan[+], Keith P Ray[$], Mary A Morse[‡], Jean-Luc Imler[#], and Nick J Gay[§*]

§Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, United Kingdom; #UPR 9022 – CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France; $Rheumatoid Arthritis Biology Department, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage SG1 2NY, United Kingdom;‡ Immunology Platform, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage SG1 2NY, United Kingdom; + INSERM U.564, CHU Angers, 49033 Angers cedex 01.

&These authors made equal contributions to this work

* To whom correspondence should be addressed

(Email: njg11@mole.bio.cam.ac.uk, Tel.: +44(0)1223-333626)

The extracellular protein Spätzle is required to activate the Toll signaling pathway in embryonic development and the innate immune defense of *Drosophila*. Spätzle is synthesized as a pro-protein that is cleaved by the last member of a serine-protease cascade. Despite the strong genetic evidence pointing to the important receptor function of Toll and its mammalian Toll-like receptor (TLR) homologues, the mechanism of activation during microbial infection is not well understood. Using recombinant proteins, we show here that the mature form of Spätzle activates the Toll receptor in cell culture *in vivo*. Radiolabelled Spätzle specifically binds to *Drosophila* cells, and to Cos-7 cells expressing Toll. Furthermore, *in vitro* experiments show that the mature form of Spätzle binds to the Toll ectodomain with high affinity (ca 80 nM) and with a stoichiometry of one Spätzle dimer to two receptors. The Spätzle pro-protein is inactive in all these assays, indicating that the pro-domain sequence, which is natively unstructured, acts to prevent interaction of Spätzle and its receptor. These studies show that cleaved Spätzle directly binds to the Toll receptor and that this interaction is sufficient to establish signaling. This process contrasts with the proposed direct sensing of microbial inducers by mammalian TLRs.

The *Drosophila* Toll protein is the founding member of an important family of signaling molecules conserved in invertebrates and vertebrates. Toll and its mammalian counterparts, the Toll-like receptors (TLRs) are type I transmembrane receptors with extracellular leucine rich repeats (LRRs) and a cytoplasmic signaling domain called the Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain. Toll was originally discovered for its role in embryonic dorsoventral patterning (*1*) in *Drosophila* and was subsequently found to direct innate immune responses to infection by fungal and Gram-positive bacterial pathogens (*2*). In mammals, TLRs mediate cell activation in response to a variety of microbial molecular stimuli such as lipopolysaccharide, peptidoglycan, bacterial DNA and others (reviewed in (*3-6*)). Upon activation, Toll and TLRs trigger an evolutionarily conserved signaling pathway leading to activation of NF-κB-like transcription factors and subsequent expression of a large number of genes, which include antimicrobial peptides in *Drosophila* or pro-inflammatory cytokines and co-stimulatory proteins in mammals. The functions of Toll and TLRs have been primarily characterized through genetic studies, and there is still considerable uncertainty regarding the biochemical mechanisms that mediate receptor activation by various stimuli.

In *Drosophila*, strong genetic evidence indicates that Toll activation requires proteolytic processing of the secreted polypeptide Spätzle (*7, 8*). However, direct binding of this polypeptide to Toll has not been documented. To address the mechanisms by which Spätzle activates Toll, we expressed and purified the pro-protein of Spätzle in a baculovirus culture system (*9*). We also purified the complete ectodomain of the Toll receptor (TollWT) and a protein corresponding to the dominant allele Toll5B, a partial ectodomain lacking part of the second block of LRRs present in TollWT (*10*)(Fig. S1). As shown in Fig. 1A,

the Spätzle pro-protein is synthesized as a disulphide bonded dimer, consistent with previous studies (*11*). Whereas the active fragment of Spätzle is likely to adopt a cystine knot structure found in several other ligands and growth factors (*12*), nothing is known about the three-dimensional structure adopted by the pro-domain or the way that it represses signaling activity. We therefore used partial proteolysis in an attempt to define domains within the Spätzle pro-domain (Fig. 1B). This experiment shows that the Spätzle pro-domain is extremely sensitive to trypsin and is completely degraded within 15 minutes, leaving intact a disulphide bonded dimer of the C-terminal 106 amino acids (C-106) (Fig. S2). C-106 remains stable in the presence of trypsin with no evidence of further degradation even after 18 hours of treatment. These findings strongly suggest that the Spätzle pro-domain does not have a fixed three-dimensional structure. This was confirmed by acquiring CD (circular dichroism) spectra of the pro-protein and C-106. As expected, the spectra for C-106 shows mainly β-sheet secondary structure with a minimum at 216 nm whereas the pro-protein spectra have a minimum shifted towards 200nm, indicating the presence of disordered regions (Fig. 1C).

In order to investigate the biological properties of recombinant Spätzle, we tested the ability of the pro-protein and the trypsin-generated C-106 fragment to mediate signaling *in vivo*. Injection of C-106 into flies led to a strong induction of the gene encoding the antifungal peptide drosomycin, a well-established target gene of the Toll pathway (Fig. 1D). By contrast, injection of the pro-protein did not activate *drosomycin* expression. Importantly, C-106 was active in a *spätzle* but not a *Toll* loss-of-function mutant background. To ascertain that the recombinant pro-protein is functional, recognized and processed *in vivo*, we injected the pro-protein into *spätzle* mutants and noted that it could

rescue inducibility of *drosomycin* upon immune challenge (Fig. 1E). We further observed that inducibility of *drosomycin* in this mutant background could be rescued by transfer of hemolymph from wild-type flies (Fig. S3). This indicates that the Spätzle pro-protein is present in the circulating hemolymph.

To address the binding characteristics of Spätzle and Toll, we used a derivative of the macrophage-like *Drosophila* S2 cell line carrying a reporter construct under the regulation of the *drosomycin* promoter. We first observed that addition of C-106 to these cells strongly activated the *drosomycin* promoter in a dose-dependent manner, with an EC_{50} of 0.5 nM, whereas the pro-protein was unable to establish signaling even at high concentrations (Fig. 2A). Cell activation by C-106 was competed out by the addition to the assay of both TollWT and Toll5B ectodomains, which points to a direct interaction between C-106 and Toll. By contrast, the Spätzle pro-protein did not act as an antagonist of Toll signaling, suggesting that it does not bind to Toll (Fig. 2B). Signaling by C-106 required Toll, as dsRNA knockdown of Toll suppressed cell activation by C-106 (Fig. 2C). Furthermore, inhibition of the other receptors of the Toll family in *Drosophila*, including Toll-5 and Toll-9, which have been shown to induce *drosomycin* in tissue culture, did not affect signaling by C-106 (data not shown; see (*13-15*)). To measure the binding affinity of Spätzle to S2 cells we labeled C-106 with ^{125}I. Scatchard analysis indicated that C-106 binds to S2 cells with a K_D of 0.4 nM and revealed 600 binding sites per cell (Fig. 2D). These data show that signaling by C-106 involves binding to a specific membrane receptor. To confirm that this interaction is mediated by Toll, we examined binding of radiolabelled C-106 to Cos-7 cells transfected with a Toll expression vector. Cos-7 cells expressing Toll bound C-106 with an affinity similar to that of S2 cells, whereas no specific binding was

detected on mock-transfected cells (data not shown). In addition, a large protein complex was detected after cross-linking iodinated C-106 to Cos-7 cells transfected with a Toll expression vector only (Fig. 2E). We conclude that Toll alone is sufficient to mediate binding and signaling by Spätzle C-106.

In the light of these results we asked whether interaction between the ectodomain of Toll, the Spätzle pro-protein and C-106 could be detected in a purified system. Firstly we mixed an excess of pure C-106 with wild-type and Toll5B ectodomains. These mixtures were separated on a calibrated gel filtration column. As shown in Fig. 3A, C-106 is able to form high molecular mass complexes with both ectodomains, confirming that Spätzle is able to bind directly and stably with the Toll ectodomains. This interaction was studied further using the techniques of surface plasmon resonance (Biacore) and isothermal titration calorimetry (ITC) (*16*). For the Biacore experiments, we immobilized TollWT, Toll5B and the human Toll-like receptor TLR2 ectodomain on a sensor chip and measured the relative response upon injection of pro-protein and C-106. As shown in Fig. 3B, Spätzle C-106 but not the pro-protein bound to TollWT and Toll5B. Neither form of Spätzle bound to the TLR2 control. High affinity binding was also observed in the reciprocal experiment with immobilized C-106, pointing to a direct physical interaction between Toll and active Spätzle. We then measured the affinity of the interaction in solution directly using ITC. These experiments gave values of 82.0 nM and 91.7 nM for TollWT and Toll5B respectively (Fig. 3C) and also reveal that the stoichiometry of the complexes formed is two Toll monomers to one Spätzle dimer.

In this report we have characterized a direct interaction between a member of the Toll/TLR family and an activating protein ligand. Our stoichiometry data (one C-106 dimer binding two Toll molecules) and the cross-linking experiments support the hypothesis that C-106 activates the Toll pathway by cross-linking two receptor molecules, a mode of activation common for type I transmembrane receptors. Interestingly, some mammalian cytokine receptors exist as dimers prior to ligand binding (*17*), and analytical ultracentrifugation shows that the Toll ectodomain is dimeric in solution prior to binding of C-106 (see Fig. S4). Taken together with other biophysical data (A.W. unpublished) this suggests a complex pathway of binding between Toll and Spätzle. .

In our experiments, C-106 binds not only to TollWT but also to Toll5B ectodomains with nanomolar affinity. This indicates that the entire ectodomain of Toll is not necessary to bind C-106. In fact, even shorter Toll truncations containing only part of the first block of LRRs are likely to retain C-106 binding capacity (*10*). In the closely related LRR receptor, platelet glycoprotein 1b, specific binding by vonWillebrand factor involves a non-LRR switch region (*18*). Thus, it is likely that Toll and C-106 will have a somewhat different structural basis for binding and that other parts of the ectodomain not involved in ligand binding may be required for receptor activation. We also show that the Toll ectodomain can compete out signaling by Spätzle. This supports the idea that soluble human TLR ectodomains might be able to inhibit signaling in disease states, for example in endotoxin shock (see (*19*)).In all our studies we could detect no binding or activating effect for the Spätzle pro-protein, which indicates that the pro-domain plays an important role in suppressing binding to and activation of Toll. The pro-domain is largely unstructured and may constitute a 'loopy' domain (*20*). This conclusion is further supported by secondary

structure predictions (*21*) which indicate that only 15% of residues in the pro-domain are in secondary structural elements compared to over 50% in C-106 (see Fig. S5). Many secreted growth factors, ligands and cytokines are produced as pro-proteins and proteolytically processed either during or after secretion. Suppression of activity by natively unstructured pro-domains may be a general phenomenon. For example vertebrate nerve growth factor (NGF), a cystine knot ligand structurally related to Spätzle, is produced as a pro-protein whose pro-domain is natively unstructured. Like Spätzle, NGF processing of the pro-protein is required to activate the TrkA receptor and promotes neuronal survival (*22*) (*23*).

In conclusion, despite the close structural and functional relationships in the Toll/TLR family, there appear to be differences in the way these receptors are activated in insects and mammals. In mammals, pharmacological studies indicate that TLR4 interacts with LPS (*24*) and cross-linking experiments with radiolabelled LPS have confirmed that LPS is in close proximity to TLR4 in a receptor complex which includes the co-receptors CD14 and MD2 (*25*). More recently, TLR2 has also been shown to bind insoluble peptidoglycan, together with CD14 (*26*). Thus, TLRs in mammals appear to require co-receptors to mediate cell activation by microbial stimuli, and their exact role in the receptor complex remains poorly characterized. By contrast, our data establish that Toll is both necessary and sufficient to mediate binding and activation by Spätzle and point to a model in which infectious non-self is recognized by circulating pattern recognition receptors such as PGRP-SA in *Drosophila* (*27*). This recognition then leads to the activation of a proteolytic cascade which generates the active form of the cytokine Spätzle and leads to inducible expression of antimicrobial peptides (*8, 28*). In this regard, the function of Toll is

in some ways reminiscent of another TIR domain receptor present in mammals, the interleukin-1 receptor, which plays a critical role the upregulation of some immune effector genes.

References and notes

1. M. P. Belvin, K. V. Anderson, *Annu Rev Cell Dev Bi* **12**, 393 (1996).
2. J. L. Imler, J. A. Hoffmann, *Trends Cell Biol* **11**, 304 (2001).
3. T. Kaisho, S. Akira, *Bba-Mol Cell Res* **1589**, 1 (2002).
4. C. A. Janeway, R. Medzhitov, *Annu Rev Immunol* **20**, 197 (2002).
5. S. R. Krutzik, P. A. Sieling, R. L. Modlin, *Curr Opin Immunol* **13**, 104 (2001).
6. D. M. Underhill, A. Ozinsky, *Curr Opin Immunol* **14**, 103 (2002).
7. D. Morisato, K. V. Anderson, *Cell* **76**, 677 (1994).
8. E. A. Levashina *et al.*, *Science* **285**, 1917 (1999).
9. Toll and Spätzle proteins with hexa-histidine tags at the C-terminus were expressed in the Bac-to-Bac baculovirus system (Gibco) and SF9 insect cells. The proteins were secreted into the medium and purified by metal affinity chromatography and FPLC Superdex 75 or 200 gel filtration columns. Full details are in supporting online material.
10. D. S. Schneider, K. L. Hudson, T. Y. Lin, K. V. Anderson, *Gene Dev* **5**, 797 (1991).
11. Y. DeLotto, R. DeLotto, *Mech Develop* **72**, 141 (1998).
12. K. Mizuguchi, J. S. Parker, T. L. Blundell, N. J. Gay, *Trends Biochem Sci* **23**, 239 (1998).

13. S. Tauszig, E. Jouanguy, J. A. Hoffmann, J. L. Imler, *P Natl Acad Sci USA* **97**, 10520 (2000).

14. J. Y. Ooi, Y. Yagi, X. D. Hu, Y. T. Ip, *Embo Rep* **3**, 82 (2002).

15. C. Luo, B. Shen, J. L. Manley, L. Zheng, *Insect Mol Biol* **10**, 457 (2001).

16. SPR experiments were carried out on a Biacore 2000 instrument (Biacore, Sweden) equipped with a research-grade CM5 sensor chip. For ITC experiments, a Microcal VP-ITC microcalorimeter was used. Full details are in supporting online material.

17. O. Livnah *et al.*, *Science* **283**, 987 (1999).

18. E. G. Huizinga *et al.*, *Science* **297**, 1176 (2002).

19. C. Zuany-Amorim, J. Hastewell, C. Walker, *Nat Rev Drug Discov* **1**, 797 (2002).

20. J. Liu, H. Tan, B. Rost, *J. Mol. Biol.* **322**, 53 (2002).

21. J. A. Cuff, M. E. Clamp, A. S. Siddiqui, M. Finlay, G. J. Barton, *Bioinformatics* **14**, 892 (1998).

22. R. Lee, P. Kermani, K. K. Teng, B. L. Hempstead, *Science* **294**, 1945 (2001).

23. A. Rattenholl *et al.*, *Eur J Biochem* **268**, 3296 (2001).

24. X. Du, A. Poltorak, M. Silva, B. Beutler, *Blood Cell Mol Dis* **25**, 328 (1999).

25. J. D. Correia, K. Soldau, U. Christen, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, *J Biol Chem* **276**, 21129 (2001).

26. H. Mitsuzawa *et al.*, *J Biol Chem* **276**, 41350 (2001).

27. T. Michel, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, J. Royet, *Nature* **414**, 756 (2001).

28. P. Ligoxygakis, N. Pelte, J. A. Hoffmann, J. M. Reichhart, *Science* **297**, 114 (2002).

29. Y. DeLotto, C. Smith, R. DeLotto, *Mol Gen Genet* **264**, 643 (2001).

30. O. Robledo *et al.*, *J Biol Chem* **272**, 4855 (1997).

Acknowledgements

We thank Girish Shah, Trevor Chapman, Peter Lowe and Martin Moncrieffe for helpful advice on baculovirus expression and biophysical techniques. We also thank John Ladbury and Tom Blundell for helpful discussions during the preparation of this manuscript. We are grateful to Martin Sims for providing access to facilities in the GlaxoSmithKline Immunology Department in Stevenage. This work was supported by CNRS and the NIH (Grant 5P01AI44220-02). S.T-D. was supported by a short-term fellowship from La Ligue Contre le Cancer. A.W. was supported by GlaxoSmithKline, The Cambridge European Trust and St. John's College, Cambridge.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org

Materials and Methods

Figs. S1, S2, S3, S4, S5

Figure legends

LEGEND FIGURE 1

Partial proteolysis of Spätzle pro-protein generates a stable and biologically active 106 amino acid C-terminal fragment.

(A) The full-length Toll ectodomain (TollWT), a truncation of Toll (Toll5B) and the Spätzle pro-protein (HL01462 isoform) (*29*)) were expressed and purified as described ((*9*) and supporting online material). Purified proteins were then analyzed by SDS-PAGE (4-12%) under reducing and non-reducing conditions. The sizes of the molecular weight markers are indicated in kDa.

(B) Spätzle pro-protein was incubated with trypsin at a w/w ratio of 100:1 and samples taken at the indicated times were analyzed by SDS-PAGE. The identity of the pro-protein and the stable fragment (C-106) were confirmed by N-terminal protein sequencing, as indicated. Intact C-termini were verified using Western blot (not shown).

(C) CD spectra of Spätzle pro-protein (solid line) and C-106 fragment (dotted line). Minima at ca 205 nm and 216 nm in the pro-protein and C-106 respectively indicate a lack of ordered structure in the Spätzle pro-domain.

(D) Injection of Spätzle active fragment C-106, but not its pro-protein (SpzFL), activates *drosomycin* expression in flies. Wild-type (WT), *spätzle* (*spz4* homozygotes = *spz-/-*) and *Toll* (*Toll-/-*) deficient flies were injected with either Phosphate Buffer Saline (PBS), 0.6 ng Spätzle pro-protein (SpzFL) or 0.3 ng Spätzle active fragment (SpzC106). As a positive control, flies were pricked with a bacterial mixture of *M.luteus* and *E.coli* (mix). Bloomington Stock Center fly stocks and nomenclature were used.

(E) Injection of recombinant Spätzle pro-protein (SpzFL) rescues activation of *drosomycin* by immune challenge in *spätzle* mutant flies. Spätzle deficient flies (*spz4/spz4*) were injected with either PBS or 3 ng of Spätzle pro-protein (SpzFL) and 4 hours later were challenged (+) or not (-) with either Gram-positive bacteria (*M.luteus*) or with fungi (*Beauveria bassiana*).

For **D** and **E**, total RNA was extracted 24h after challenge and analyzed by RNA blotting and hybridization with probes for the drosomycin gene and the ribosomal protein gene rp49.

LEGEND FIGURE 2

The processed form of Spätzle, but not the pro-protein, binds to and activates Toll.

(A) The cleaved form of Spätzle, but not the pro-protein, activates the *drosomycin* promoter in a dose-dependent manner in S2 cells. S2 cells expressing a *drosomycin-luciferase* reporter construct (10) were cultured for 16 hours in tissue-culture medium supplemented with increasing concentrations of either the processed form (C-106) or the pro-protein form (FL) of Spätzle. Cells were lysed and luciferase activity measured as described (11). The data represent mean +/- standard deviation of triplicates.

(B) Recombinant soluble Toll ectodomains (wild-type (WT) or truncated (5B)), but not the Spätzle pro-protein, compete for *drosomycin* promoter activation. S2 cells expressing a *drosomycin-luciferase* reporter construct were cultured with 4 nM SpzC106 and increasing concentrations of Toll ectodomains or unprocessed Spätzle pro-protein. Cells were lysed 16 hours later and luciferase activity determined. Experiments were done in triplicates and the results represent means +/- standard deviations.

(C) Activation of the *drosomycin* promoter by SpzC106 in S2 cells is Toll dependent. S2 cells were co-transfected with a *drosomycin-luciferase* reporter construct and double-stranded RNA corresponding to GFP or Toll. 72 hours after transfection, the cells were stimulated with 1 nM SpzC106 (+) or left untreated (-) for 16 hours. Cells were then lysed and luciferase activity measured. Means +/- standard deviation of triplicates are shown.

(D) Scatchard analysis of ^{125}I-labelled SpzC106 binding to S2 cells. Binding experiments were performed by incubating *Drosophila* S2 cells in the presence of increasing concentrations of radiolabelled SpzC106. After 2 hours incubation period at 4°C, bound

radioactivity was separated from the unbound fraction by centrifugation. The specific binding component was obtained by subtracting from the total bound radioactivity the values obtained in the presence of a 100-fold excess of cold ligand. The affinity-binding constants and site numbers were obtained by Scatchard transformation of the values (see (*30*)).

(E) Cos-7 cells transfected with a Toll expression vector bind radiolabelled SpzC106. 3 x 10^6 cos-7 cells were transfected with an empty vector (mock) or a vector expressing Toll. 48 hours later, they were incubated with 5 nM radiolabelled SpzC106 alone (-) or in the presence of a 100-fold excess of cold competitor (+) for 2 hours followed by 45 minutes in the presence of 1mM EGS and BS3 cross-linking agents. Cell lysates were submitted to SDS-Page and autoradiography (*30*). Sizes of the molecular weight markers are indicated in kDa.

LEGEND FIGURE 3

Spätzle C-106 but not pro-protein binds with high affinity to the Toll ectodomain and with a stoichiometry of one Spätzle dimer to two Toll receptor molecules.

(A) Purified TollWT and Toll5B ectodomains were mixed with an excess of Spätzle C-106 and analyzed on a calibrated FPLC gel filtration column (Superdex 200; see also supplementary material). Individual peaks were analyzed by SDS-PAGE as indicated. **(B)** Surface plasmon resonance (Biacore) experiments. TollWT, Toll5B and human TLR2 ectodomain were immobilized on a Biacore sensor chip and sensorgrammes recorded upon injection of Spätzle proteins (see online supporting material). **Sensorgram a:** The Spätzle C-106 fragment shows binding to immobilized TollWT (upper) and Toll5B (middle) but not TLR2 ectodomain (lower curve) **Sensorgram b:** the Spätzle pro-protein shows no binding to immobilized TollWT, Toll5B and TLR2. **Sensorgram c:** In a reciprocal experiment, Spätzle C-106 and pro-protein were immobilized on the chip and a sensorgram recorded upon injection of TollWT. TollWT binds to immobilized C-106 (upper curve) but not pro-protein (lower curve).

(C) Isothermal titration calorimetry. TollWT and Toll5B and buffer control samples were injected into a solution of C-106 in the measuring cell. Binding heats were measured and interpreted as outlined (see supplementary information). The affinity and stoichiometry of the measured binding experiments are shown in the table.

Supporting online material

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Standard chemicals were purchased from Sigma if not otherwise stated. Ni-NTA Superflow resin, Anti-Penta-His antibodies and anti-Penta-His-HRP conjugates were from Qiagen.

Cell Culture

For baculovirus generation, *Spodoptera frugiperda* SF9 were used and cultured at 27°C in Nunc Nalgene 6-well plates and tissue culture flasks using SF900II media (Invitrogen) supplemented with 2% Foetal Bovine Serum and 1% pluronic acid (Sigma). For suspension culture protein expression SF9 and *Trichoplusia ni* cells were grown in disposable polycarbonate Erlenmeyer flasks (Corning Costar) and usually maintained below 2.0 x 10^6 cells/ml in serum-free SF900II media + pluronic acid.

Drosophila S2 cells were purchased from Invitrogen and grown at 23 °C in Schneider's medium (Biomedia, Boussens, France) supplemented with 10% FCS.

Cos-7 cells were purchased from ATCC and maintained in RPMI culture medium supplemented with 10% FCS.

Generation of baculoviruses for Toll and Spätzle constructs

The cDNA for *Drosophila Toll* (Genebank M19969) was a gift from NH Brown (Brown, 1988) and the Spätzle EST clone HL01462 was purchased from Research

Genetics/Invitrogen. The EST clone was sequenced and the *Spz* sequence confirmed (sequence corresponds to the reported Spätzle isoform 11.6 (*1*) without amino acids 189 - 196). Human TLR2 cDNA was derived from cDNA clone #5591607 purchased from Incyte Pharmaceuticals Incorporated.

All expression clones were generated by PCR introducing *BamH*I and *Not*I restriction sites respectively at either end, and a C-terminal rTEV protease cleavage site and 6xHistidine tag. Clones contained residues 1- 801 of *Toll*, 1-668 of Toll5B, full length Spätzle and residues 1-587 of human TLR2.

All PCR products were subcloned into pFastBac1 (Invitrogen) to yield plasmids pFastBac1.TollWT, pFastBac1.Toll5B, pFastBac1.HL01462 and pFastBac1.TLR2, respectively. These vectors were used for to generate recombinant baculoviruses using the Bac-to-Bac baculovirus system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Initial virus was obtained 72 hours post-transfection and amplified by infection of 50 ml SF9 suspension cultures maintained at 1.0 x 10^6 cells/ml in 2% FBS. Protein expression was confirmed by Western Blot on crude cell culture supernatant using anti-Penta-His-HRP conjugate (Qiagen). The viral master stock was used to obtain 1 L working stocks by amplification in SF9 cells using an MOI of 0.1. Titers were usually in the range of 1.0 x 10^8-10^9 pfu/ml and were determined using a Rapid Titer Kit by Clontech.

Protein Expression and Purification

For protein expression, 10L suspension cultures of SF9 cells in serum-free conditions were infected at MOI of 1.0 and a density of 10^6 cells/ml and the supernatant harvested 72 hours (TollWT and Toll5B) or 48hours post infection (Spätzle), respectively.

TLR2 was expressed in *T.ni* cells under serum-free conditions for 72 hours at MOI 1.0. Subsequently, cells and debris were removed by centrifugation at 1500 rpm for 15 minutes. Protein containing supernatant was then concentrated on a Centramate tangential flow filtration system (Pall Filtron) to a volume of 500 ml with buffer exchange (15L binding buffer 150 mM NaCl, 20 mM TrisHCl pH 7.5). After addition of EDTA-free protease inhibitors (Roche), the supernatant was loaded onto Qiagen Superflow NiNTA agarose at 0.5-1 ml/min using an Äkta FPLC (Amersham Pharmacia) system at 4 °C. The resin was washed with buffer containing 30 mM Imidazole and 6xHis-tagged proteins eluted at 250 mM imidazole. Fractions were analysed by SDS-PAGE on NuPage pre-cast gels (Invitrogen) and stained using Coomassie blue or Silver Staining. Relevant fractions were then pooled and subsequently purified by gel filtration on Superdex 75 or 200 columns. Gel filtration columns were calibrated with MW standards by Amersham Pharmacia. Protein yields were either quantitated by the Bradford method or absorption at 280 nm.

Partial proteolysis experiments

30 µg of Spz full-length HL01462 protein were incubated at 37°C with 0.3 µg of trypsin (w/w 100:1) in 100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl buffer pH 6.5. 90 µl samples were taken after 0.5, 1, 2, 4 hours and after overnight incubation, 10 µl protease inhibitors (Boehringer) added and frozen until analysis. Proteins were then separated by SDS-PAGE and protein bands of interest analysed by N-terminal protein sequencing. Intact C-termini were verified by Western blot analysis using anti-His-HRP conjugate (Qiagen).

Preparative digests of full-length Spätzle protein were performed by the addition of trypsin (w/w ratio 75:1) to the protein sample in 100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl buffer pH

6.5 and the mixture was incubated at 37 °C for 60 minutes. Subsequently, TLCK protease inhibitor (Boehringer) was added to a final concentration of □M and the pH adjusted to 7.5. To remove trypsin and N-terminal degradation products, the sample was then purified on Ni-NTA agarose as described above.

For the removal of the His-tag from purified proteins for SPR experiments, samples were incubated with 1 unit of recombinant His-tagged TEV protease (Invitrogen) per 5 □g of protein for 6 hours at 30 °C in rTEV buffer without DTT. After the incubation period, protease inhibitors were added and the mixture purified on Ni-NTA resin as described above. Non-His-tagged protein was found in the flow-through and initial wash fractions and the removal of the His-tag verified by SDS-PAGE and subsequent Western Blot using anti-Penta-His-HRP conjugates.

Luciferase assays

Drosophila S2 cells were used to monitor activation by Spätzle. A stable cell line (648-1B6) expressing the luciferase reporter gene under the control of the *drosomycin* promoter was established from S2 cells (Invitrogen) and grown at 23 °C in Schneider's medium (Biomedia, Boussens, France) supplemented with 10% FCS and Puromycin (1 □g/ml). Cells were activated overnight by addition of recombinant Spätzle to the culture medium. For competition experiments (Fig2B), other recombinant proteins were added simultaneously to the culture medium. Cells were then lysed in reporter lysis buffer and luciferase activity was measured in a luminometer (BCL Book, Promega, Madison, WI) immediately after addition of the substrate (luciferin, Promega).

Fly strains and crosses

As control, we used *yellow(y) white (w)* DD1; *cinnabar brown (cn bw)* flies (*2*). spz^{rm7} (renamed spz^{4}), Tl^{632} (renamed Tl^{r3}) and Tl^{RXA} (renamed Tl^{RV1}) are described in Flybase (http://flybase.bio.indiana.edu/). *yellow(y) white (w)* DD1; *cinnabar brown (cn bw)* and spz^{4} were maintained at 25 °C. Transheterozygote Tl^{r3}/Tl^{RV1} flies were grown at 18 °C and shifted to 29 °C at the adult stage at least three days before challenge. All flies were grown on a standard cornmeal medium

Infection and injection experiments.

Septic injuries were performed at 25 °C by pricking flies with a tungsten needle previously dipped in a concentrated culture of *Micrococcus luteus* only or in a mixture of *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* (mix). *M luteus* induces the Toll pathway and *E. coli* induces the Imd pathway. For natural fungal infection, which specifically induces the Toll pathway (*3*), anaesthetized flies were manually shaken for 30 s on a Petri dish containing a sporulating culture of *Beauveria bassiana*. Flies were thereafter kept at 29 °C. Recombinant proteins (4 or 20 nl as indicated) were injected into anaesthetised flies using a Nanoject II apparatus (Drummon scientific). Hemolymph (Fig. S2) was collected from donor flies using the same apparatus and immediately injected into host flies which were allowed to recover for 4 hours at 25°C before immune challenge. Total RNA extraction and Northern blot analysis were performed as described (*4*).

Double-stranded RNA interference

dsRNA was produced as described in (*5*). Briefly, 700 bp coding sequence DNA fragments from the genes to be inactivated were amplified by PCR, using primers containing a 5' T7 RNA polymerase binding site. Primer sequences were: GFP/anti-sense: 5'-TTT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG T-3'. GFP/sense: 5'-TTT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA G-3'. Toll/anti-sense: 5'-TTT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TGG GTG AGA TTG GTA GGC AG-3'. Toll/sense: 5'-TTT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CTC CAG TTG AGG GAG CTG G-3'.

The purified PCR products were then used as templates for in vitro transcription using the MEGASCRIPT T7 transcription kit (Ambion, Austin, TX). The dsRNA products were annealed by incubation at 65 °C for 30 minutes followed by slow cooling to room temperature, and stored at –20 °C. S2 cells (10^6/ml) were transfected in 6 cm diameter dishes by the calcium phosphate precipitation technique with 0.1 μg of the *drosomycin*-luciferase reporter plasmid, 0.1 μg of an *actin5C-lacZ* control reporter, and 4 μg of dsRNA. 48 h after the transfection the cells were stimulated overnight by addition of recombinant SpzC106 (20 nM) to the culture medium. Luciferase activity was measured as described above. β-galactosidase activity was measured by using O-nitrophenyl-β-D-galactoside as a substrate, and the values were used to normalize variability in the efficiency of transfection.

Radiolabeling, Binding, and Cross-linking Experiments

SpzC106 was iodinated by the two-phase method as described previously (*6*). The specific activity of radiolabelled product was 7289 cpm/fmol. S2 cells (2 x 10^6) were incubated with the indicated concentrations of radiolabelled ligand, and the non-specific

binding component was measured by including a 100-fold excess of unlabeled SpzC106. After 2 hours incubation at 4 °C, cell-bound radioactivity was separated from the unbound fraction. Determination of affinity binding constants was performed according to Scatchard. For cross-linking experiments, 2 x 10^6 cos-7 cells were incubated in the presence of 5.4 nM ^{125}I-labeled SpzC106 with or without a 100-fold molar excess of unlabeled protein.

Cells were transfected using the DEAE-dextran method *(7)*, and analyzed in binding studies 48h later. The cDNA encoding Toll was subcloned in pCDNA3.1 (InVitrogen).

After a 2 hours incubation with agitation at 4 °C, cells were washed extensively and incubated for an additional 45 min at 20 °C in phosphate-buffered saline, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM BS3 (Pierce), 1 mM EGS (Pierce), pH 8.3. After washes, cells were lysed in lysis buffer containing 1% Brij 96 . Insoluble material was pelleted, and the supernatants were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Surface plasmon resonance (SPR)

All SPR experiments were carried out on a Biacore 2000 instrument using standard research grade CM5 sensor chips after amine coupling of approximately 8000 RU anti-Penta-His antibody (Qiagen) diluted 1:10 in sodium acetate buffer pH 4.0 according to the manufacturer's instructions. Subsequently, 6xHis-tagged proteins were immobilised on individual flow cells by antibody capture as follows: Approximately 1000, 1750 and 2200 RU of TLR2, TollWT and Toll5B protein respectively, were captured on flow cells 2 – 4 and flow cell 4 left blank. This experiment used Spätzle C-106 and pro-protein at 1.125 □M. In a reciprocal set-up, Spätzle C-106 and pro-protein were captured to 700 RU and

1000 RU respectively, on flow cells 2 and 3 (flow cell 1 and 4 blank). Binding curves are shown for a TollWT used at 250 nM. The analyte were injected at a flow rate of 20 μl/min using the KINJECT settings on Biacore 2000 and recording sensorgrammes at High sensitivity. Typically injections were performed for 180 s with 240 s dissociation time. Data were analysed using BiaEval 3.1 software according the manufacturer's instructions.

Isothermal titration calorimetry (ITC)

For ITC experiments, a Microcal VP-ITC microcalorimeter was used. Measurements were carried out at 25 °C by injecting TollWT or Toll5B at concentrations of 148 μM or 105 μM, respectively (monomer concentrations) into the measuring cell containing C-106 fragment at concentration of 4.98 μM (dimer concentration). Data were subsequently imported into ORIGIN Software and processed as recommended by the manufacturer. Protein concentrations were determined by amino acid analysis for maximum accuracy.

Analytical ultracentrifugation

Analytical ultracentrifugation was carried out on a Beckman XL-1 analytical ultracentrifuge. Runs were performed at 5000 and 10000 rpm and interference data recorded in the process. For data analysis, Win NonLin (Dennis, J.E., Gay, D.M., and Welsch, R.E. "An adaptive nonlinear least-squares algorithm", ACM Transactions on Mathematical Software, 1981) was used for non-linear regression. Computed ϕ values were imported into Sednterp software (T.M. Laue, B.D. Shah, T.M. Ridgeway and S.L.

Pelletier, Analytical ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science, Royal Society of Chemistry, 1992, pp 90-125) and molecular weights calculated.

Circular Dichroism Measurements

Circular Dichroism spectra were measured using an Aviv Model 215 Circular Dichroism spectrometer. Proteins were analysed in 20 mM NaCl 20 mM phosphate buffer pH 7.2 and data recorded between 240 and 195 nm. Raw data were averaged from duplicate runs and a buffer control subtracted.

References supporting online material

1. Y. DeLotto, C. Smith, R. DeLotto, *Mol Gen Genet* **264**, 643 (2001).
2. S. Rutschmann *et al.*, *Nat Immunol* **1**, 342 (2000).
3. B. Lemaitre, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, *P Natl Acad Sci USA* **94**, 14614 (1997).
4. S. Tauszig, E. Jouanguy, J. A. Hoffmann, J. L. Imler, *P Natl Acad Sci USA* **97**, 10520 (2000).
5. J. C. Clemens *et al.*, *P Natl Acad Sci USA* **97**, 6499 (2000).
6. H. Gascan *et al.*, *J Immunol* **144**, 2592 (1990).
7. O. Robledo *et al.*, *J Biol Chem* **272**, 4855 (1997).

LEGENDS FOR SUPPLEMENTAL FIGURES

(S1) Schematic representation of expressed Toll and Spätzle constructs illustrating structural features.

(S2) Like the pro-protein Spätzle C-106 forms disulphide-linked dimers. Spätzle pro-protein was treated with trypsin overnight and analyzed alongside untreated sample under reducing and non-reducing sample on SDS-PAGE (10%).

(S3). The Spätzle pro-protein is present in circulating hemolymph. *Spätzle* mutant flies were injected with hemolymph collected from either wild-type (WT) or *spätzle* (*spz-/-*) mutant flies. 4 hours later, flies were challenged with either Gram-positive bacteria *(M.luteus*) or fungi (*B. bassiana*). 24h after challenge, total RNA was extracted and analyzed by RNA blotting using a probe derived from *drosomycin*. A probe recognizing the RNA coding for ribosomal protein 49 (RP49) was used to ensure that comparable amounts of RNA were loaded in all lanes.

(S4) The Toll extracellular domain is dimeric in solution. Toll and Toll5B samples were analyzed on analytical ultracentrifugation and sedimentation measured by interference (fringe). Samples were fitted and molecular weights calculated as outlined. Raw data and fit displayed for TollWT experiment only. All data are summarized in the table.

(S5) Secondary structure prediction shows a low content of structured regions in the Spätzle pro-domain. The full Spätzle pro-domain protein sequence was submitted to the JPRED server (21) and generated results are displayed. Regions with predicted beta-sheet structure are colored yellow, alpha-helical regions in red.

Figure 1

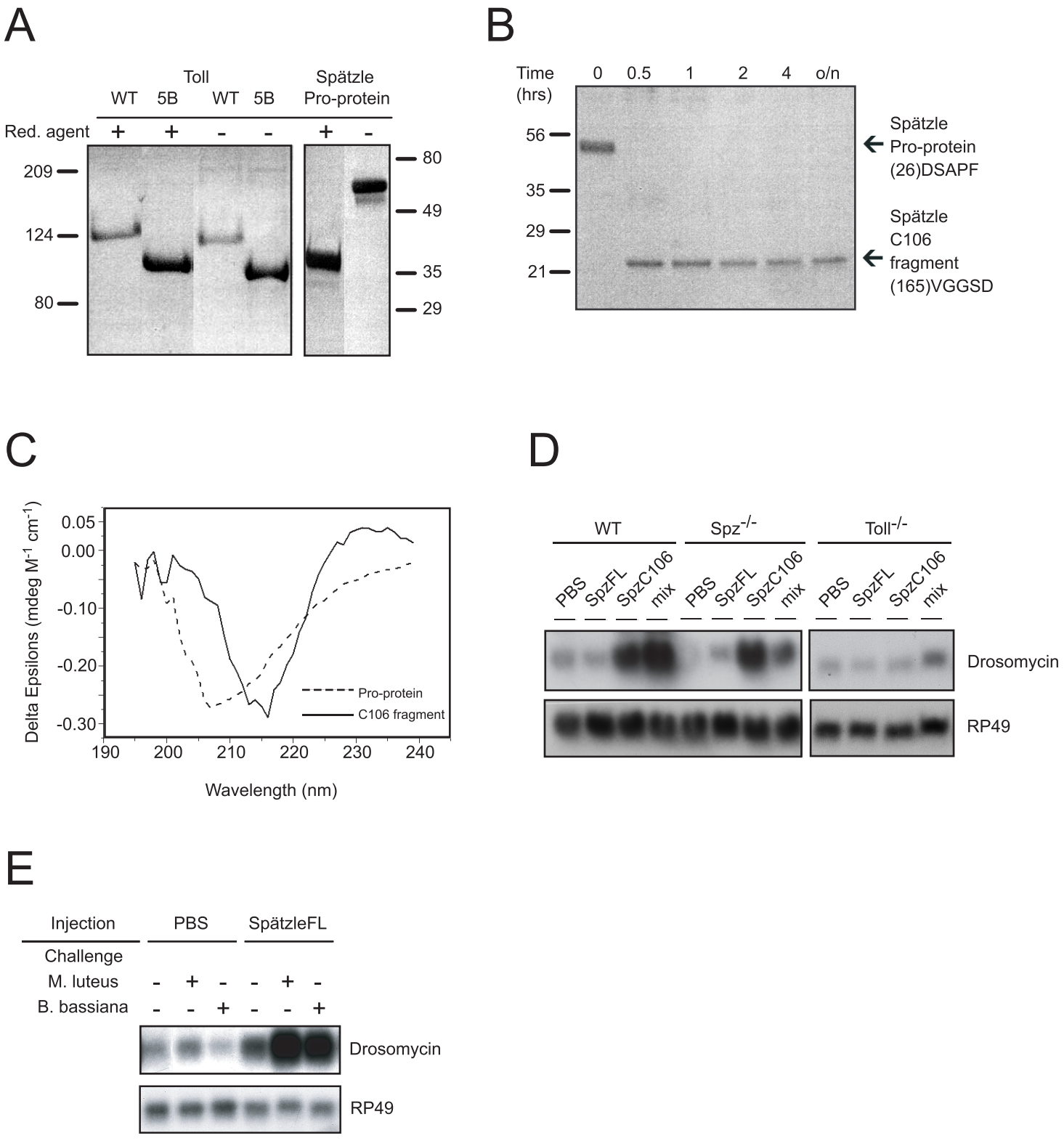

A
Toll
WT 5B WT 5B
Spätzle
Pro-protein
Red. agent + + - - + -
209
124
80
80
49
35
29
B
Time (hrs) 0 0.5 1 2 4 o/n
56
35
29
21
Spätzle Pro-protein (26)DSAPF
Spätzle C106 fragment (165)VGGSD
C
Delta Epsilons (mdeg M-1 cm-1)
0.05
0.00
-0.10
-0.20
-0.30
190 200 210 220 230 240
Wavelength (nm)
Pro-protein
C106 fragment
D
WT
Spz-/-
Toll-/-
PBS SpzFL SpzC106 mix PBS SpzFL SpzC106 mix PBS SpzFL SpzC106 mix
Drosomycin
RP49
E
Injection PBS SpätzleFL
Challenge
M. luteus - + - - + -
B. bassiana - - + - - +
Drosomycin
RP49

Figure 2

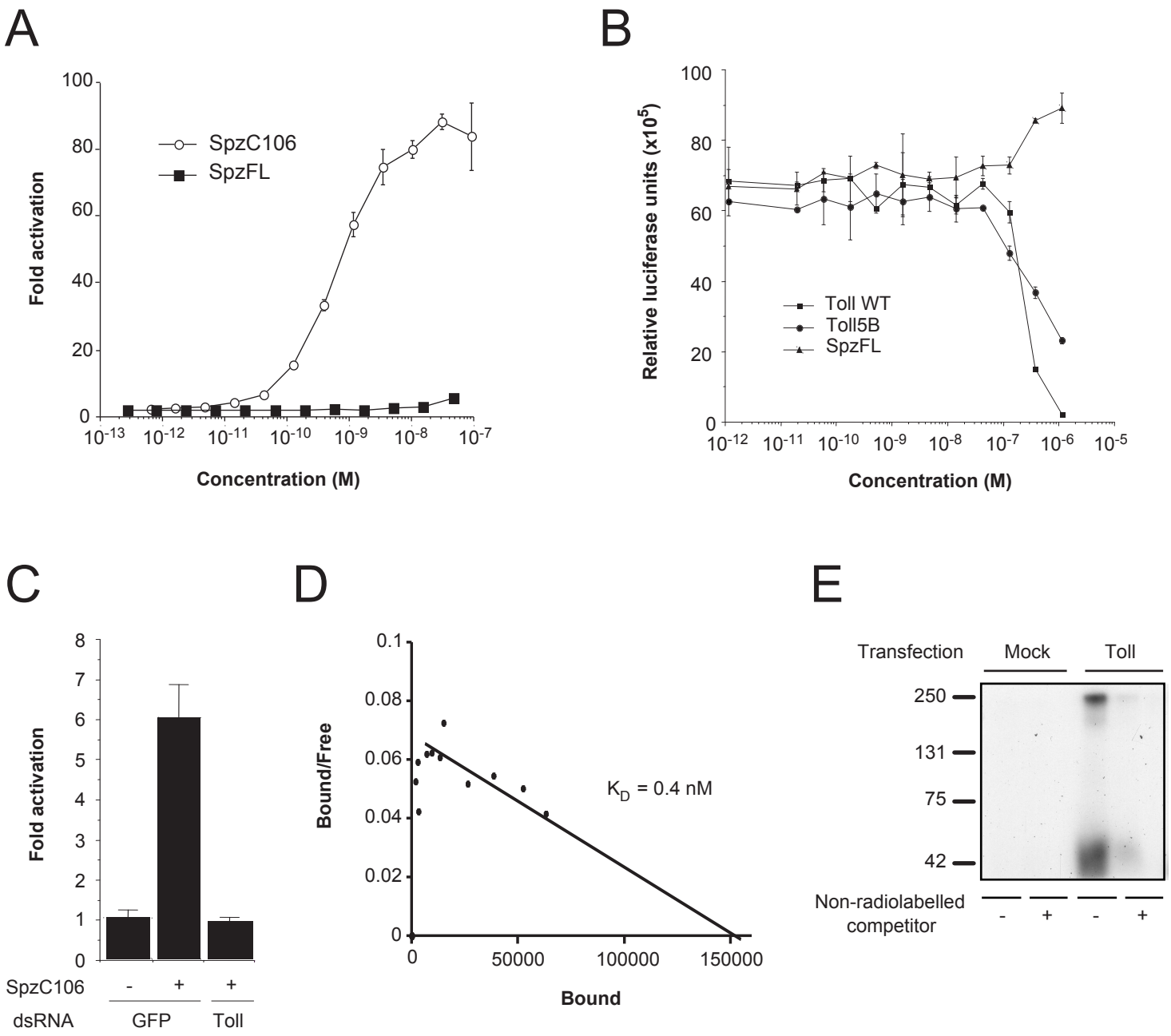
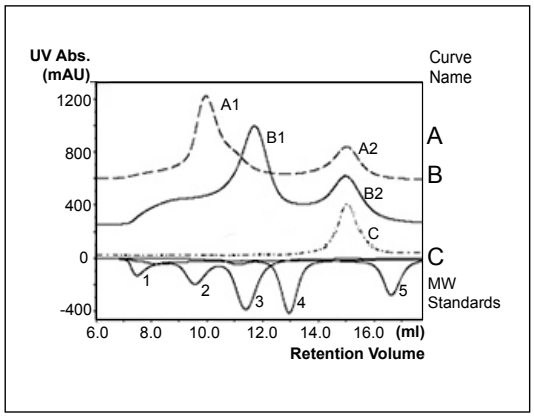
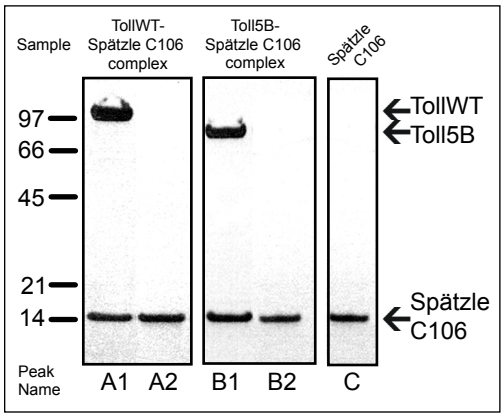

A
Fold activation
SpzC106
SpzFL
Concentration (M)
B
Relative luciferase units (x10^5)
Toll WT
Toll5B
SpzFL
Concentration (M)
C
Fold activation
SpzC106
dsRNA
GFP
Toll
D
Bound/Free
K_D = 0.4 nM
Bound
E
Transfection
Mock
Toll
250
131
75
42
Non-radiolabelled competitor

Figure 3

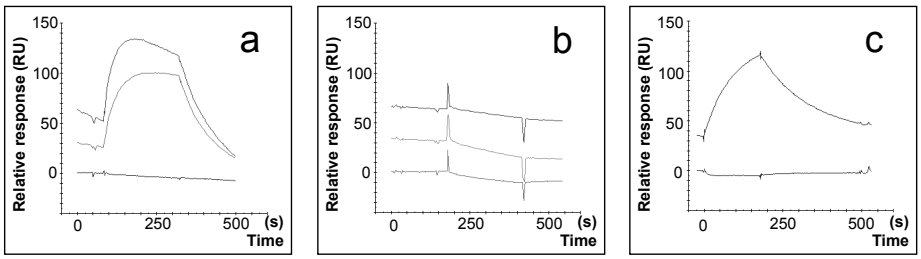
A



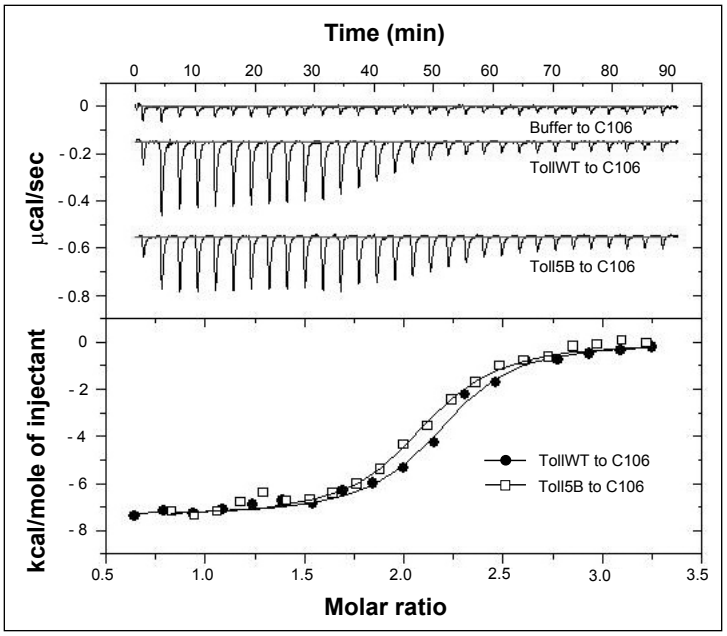
MW Standards No.	Molecular weight (kDa)
1	2000
2	232
3	158
4	67.2
5	13.7



B



C

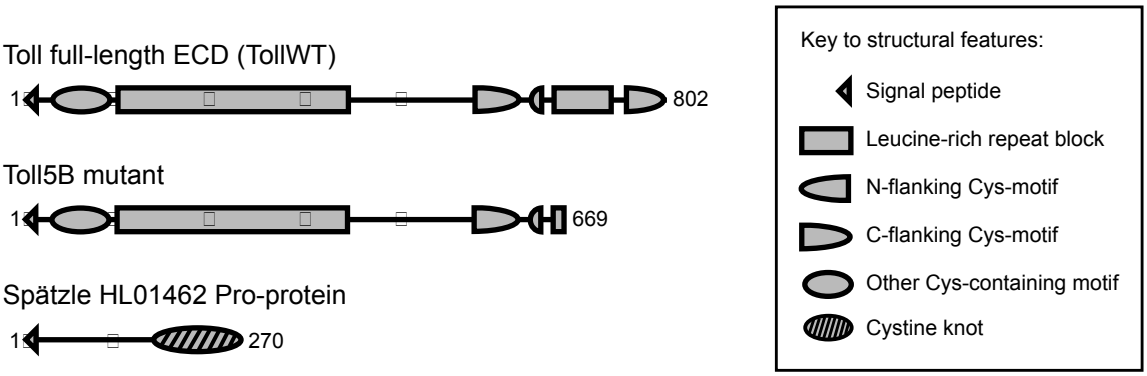


Isothermal titration calorimetry binding data

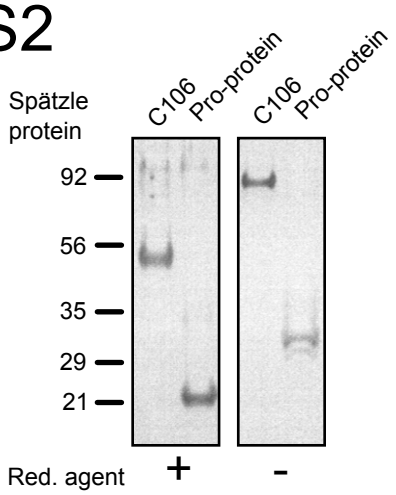
Protein in Cell (A)	Spätzle C106	Spätzle C106
Protein in Syringe (B)	TollWT	Toll5B□□
K_D□	82.0 nM (+/- 8.8 nM)	91.7 nM (+/- 12.4 nM)
Stoichiometry (A : B)	1 : 2.12	1 : 2.05

Supplemental Figures

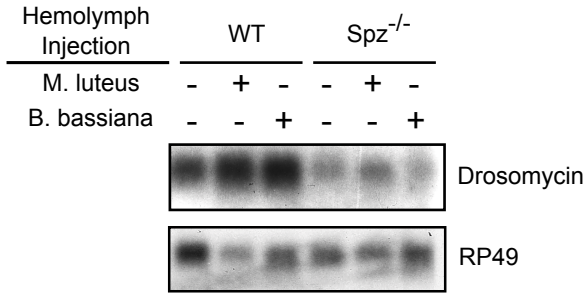
S1



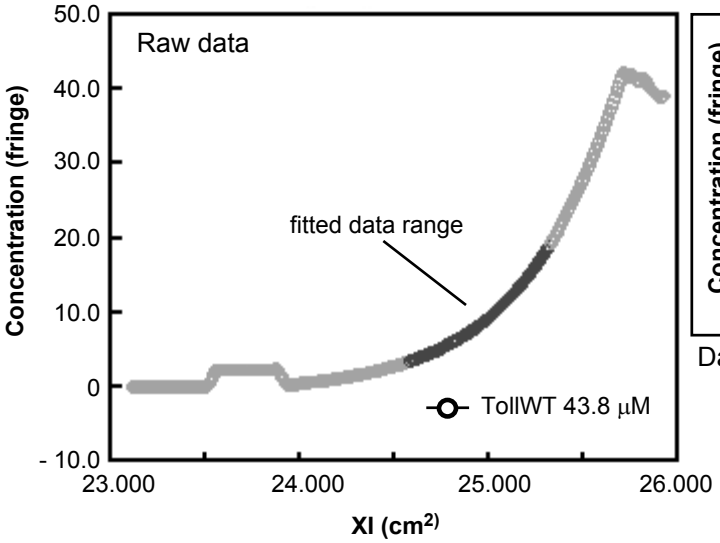
S2

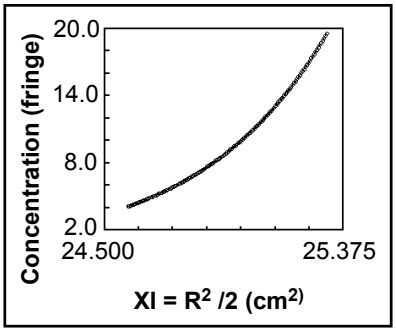


S3

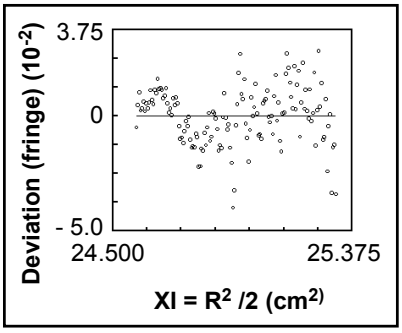


S4





Data fit



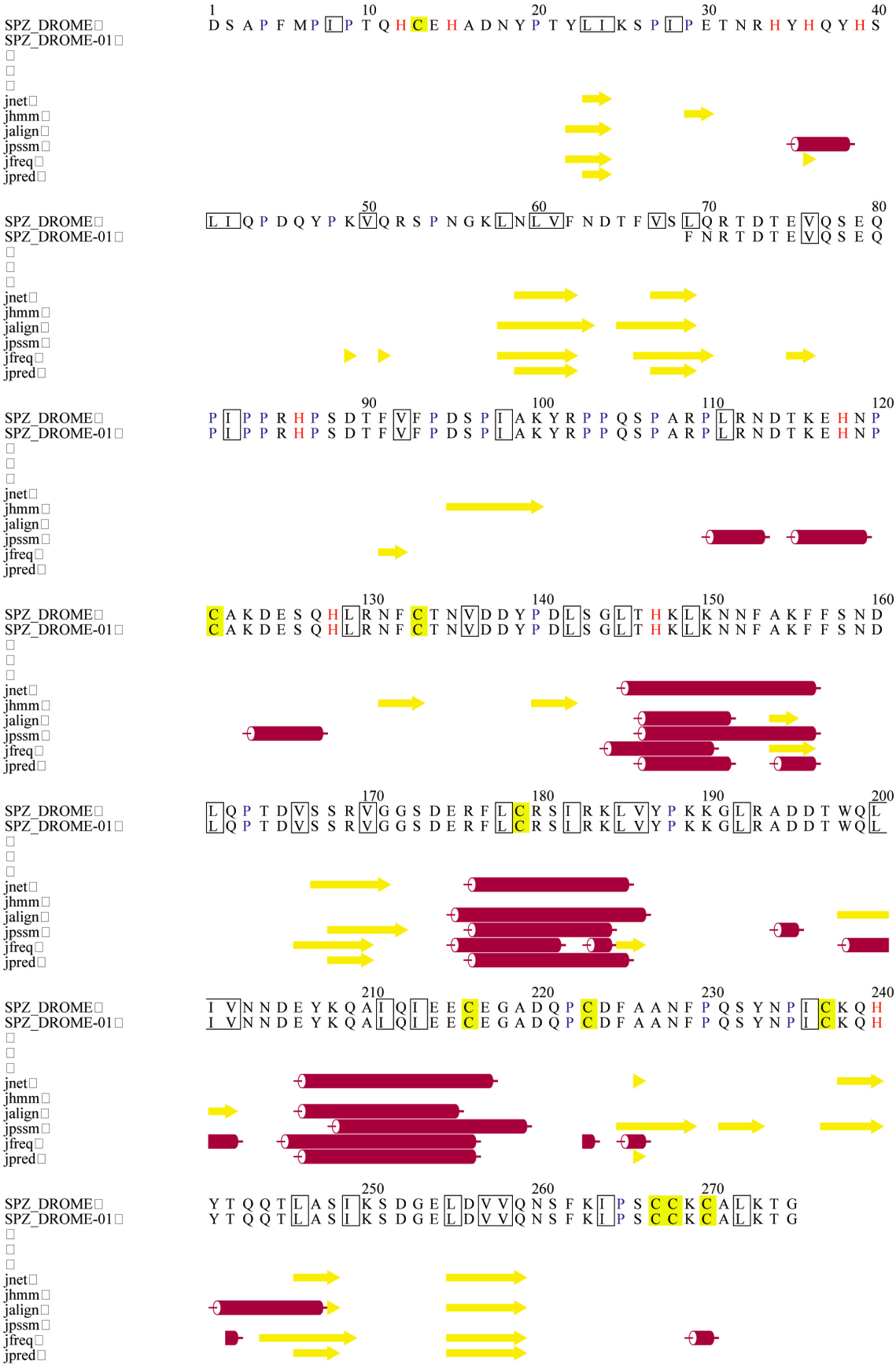
Residuals

Analytical ultrafiltration data

Protein	TollWT	Toll5B
Protein concentration (μM)	43.8*	31.4
Computed σ value	0.534	0.566
Determined MW (kDa)	178.0	136.2
* data shown		
Computed monomeric MW (kDa)	95	70

Supplemental Figures

S5



III.2. Un corécepteur pour Toll ?

Les données de l'article 3 montrent qu'un dimère SpzC106 se lie à deux récepteurs Toll *in vitro*, ces résultats sont cohérents avec le poids moléculaire du complexe observé en crosslink. Nous avons voulu savoir si Toll recrutait un membre de la famille des récepteurs Toll comme corécepteur pour la signalisation induisant l'activation du promoteur de la *drosomycine*. Par la technique de RNAi, nous avons inhibé l'expression de chaque récepteur Toll individuellement dans les cellules S2 activée par ajout de SpzC106 dans le milieu de culture (Figure 14). Aucun des ARN double-brin codant les différents membres de la famille n'inhibe l'activation du promoteur de la *drosomycine* par SpzC106.

Nous concluons que Toll fonctionne comme un récepteur de cytokine, se liant après homodimérisation à Spätzle clivée. Nos résultats montrent également que le domaine aminoterminal de Spätzle empêche l'interaction avec Toll.

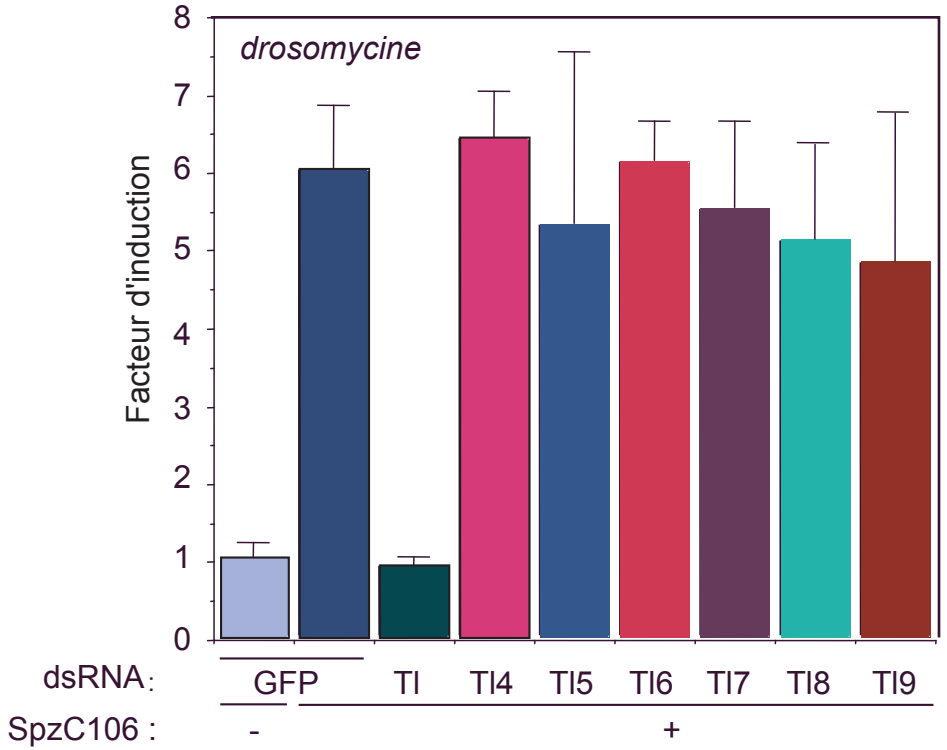


Figure 14. L'activation du promoteur de la *drosomycine* dans les cellules S2 par SpzC106 est dépendante de Toll mais pas des autres membres de la famille. Les cellules S2 sont cotransfectées avec le gène rapporteur *luciférase* sous contrôle du promoteur de la *drosomycine* et l'ARN double-brin correspondant à la GFP pour contrôle, ou aux différents Tolls, Toll-4 à -9. 72 heures après transfection, les cellules sont stimulées avec 1nM de protéine recombinante SpzC106 (+) ou laissées non stimulées (-) pour 16 heures. Les cellules sont ensuite lysées et l'activité luciférase est mesurée. Les barres d'erreur sont calculées pour trois expériences indépendantes.

DISCUSSION

I. Les Tolls de drosophile et les TLRs de mammifères définissent deux sous-familles de récepteurs.

La comparaison des séquences des récepteurs Toll que nous avons identifiés chez la drosophile avec celles des TLRs, que ce soit au niveau des domaines extracellulaires ou intracellulaires, montre que l'on peut définir deux sous-familles au sein des récepteurs Toll/TLRs. La première contient huit des neuf Tolls de drosophile, et constitue la sous-famille des Tolls, la seconde contient les TLRs de mammifères, ainsi que Toll-9. Nous décrivons ci-dessous les principales différences entre ces deux sous-familles et leurs possibles implications fonctionnelles. Nous discutons à la fin le cas de Toll-9.

I. 1. Différence des ectodomaines.

I. 1. a. Le motif N-flank est spécifique des Tolls de drosophile.

Les ectodomaines des Tolls et des TLRs diffèrent par leurs longueurs, le nombre de répétitions LRR, et la présence de motifs riches en cystéines flanquant les LRRs. Le motif N-flank (NF) qui borde les LRRs du côté amino-terminal permet d'établir une première distinction entre les Tolls et les TLRs (Figure 4). Les Tolls possèdent au moins un motif NF alors que les TLRs n'en ont pas. Ce motif semble spécifique des Tolls d'invertébrés puisqu'on le retrouve par ailleurs dans les Tolls des moustiques *Anopheles gambiae* et *Anopheles aegypti* (Luna et al., 2002) (Luna et al., 2003) (Christophides et al., 2002), dans le récepteur TOL-1 de *Caenorabditis elegans* (Pujol et al., 2001) et dans le récepteur BmToll du ver à soie *Bombyx mori*(Imamura and Yamakawa, 2002). Ce domaine est présent dans de nombreuses autres protéines d'organismes Eukaryotes contenant des LRRs, même s'il est moins fréquent que le motif C-flank (CF). Ainsi, sur 190 protéines à répétitions LRR contenant des motifs flanquant riches en cystéines, seules 72 contiennent un motif NF (Kajava, 1998). Cette observation montre que le domaine NF n'est pas indispensable à la fonction des protéines à LRR. Cependant, une autre conclusion de cette étude est que le motif NF est très conservé parmi les 72 séquences, alors

que le motif CF est fortement diversifié. Cette observation soulève la question de la fonction de ce motif. Des données biochimiques indiquent que les 4 cystéines composant le motif NF sont impliquées dans des ponts disulfures (Hashimoto et al., 1991). L'étude de mutants dans le gène Toll a permis de mettre en évidence la mutation perte de fonction Tl^{r26} qui résulte d'un changement de valine en alanine à l'intérieur du motif NF de Toll (Schneider et al., 1991) (Figure 15). Les femelles homozygotes pour cette mutation produisent des embryons dorsalisés, ce qui signifie que cette mutation entraîne une perte de fonction partielle du récepteur Toll. Dans le cas du récepteur GPIb chez l'Homme, il a été montré que deux acides aminés du motif NF du récepteur GPIb sont mutés chez des patients atteints de la maladie de Willebrand, une pathologie qui affecte l'adhésion plaquettaire. Ces mutations entraînent un gain de fonction augmentant l'affinité du récepteur pour son ligand, le facteur de Willebrand (Moriki et al., 1997). Le domaine NF a ainsi un rôle structural ou fonctionnel important. Quelle est la fonction d'un tel motif? Les protéines possédant un motif NF ont toutes une partie extracellulaire (Buchanan and Gay, 1996). Certaines sont des molécules de la matrice extracellulaire comme Slit (Rothberg et al., 1990) ou des protéoglycanes (Kresse et al., 1993), d'autres interagissent avec la matrice extracellulaire. Parmi ces dernières, on trouve les récepteurs plaquettaires GpIb, mentionné ci-dessus, GpV, GpIX (Lopez and Dong, 1997), ou des molécules d'adhésion chez la drosophile, comme Tartan, Capricious (Milan et al., 2001) et la Chaoptine (Reinke et al., 1988).

Les récepteurs Toll pourraient intervenir dans des interactions avec la matrice extracellulaire ou être impliqués dans d'autres mécanismes d'adhésion cellulaire. Cette fonction d'adhésion cellulaire a d'ailleurs été suggérée pour Toll et 18w. En effet, la surexpression de Toll ou 18W dans les cellules S2 induit la formation d'agrégats cellulaires (Keith and Gay, 1990) (Eldon et al., 1994). Par ailleurs, Toll et 18w sont exprimés dans des régions de l'embryon qui s'invaginent au cours du développement (Gerttula et al., 1988) (Eldon et al., 1994) (Chiang and Beachy, 1994). Notre étude du profil d'expression des récepteurs Toll a montré que Toll-6, Toll-7 et Toll-8 sont également exprimés fortement aux stades embryonnaire et pupal. Cette étude a été poursuivie au laboratoire par l'équipe de Maria Capovilla, qui a montré que les récepteurs Toll sont exprimés dans des sites morphogénétiques importants au cours du développement embryonnaire (Kambris et al., 2002) (Figure 16). Cette étude a, en particulier, permis de montrer que Toll-5 est exprimé dans les

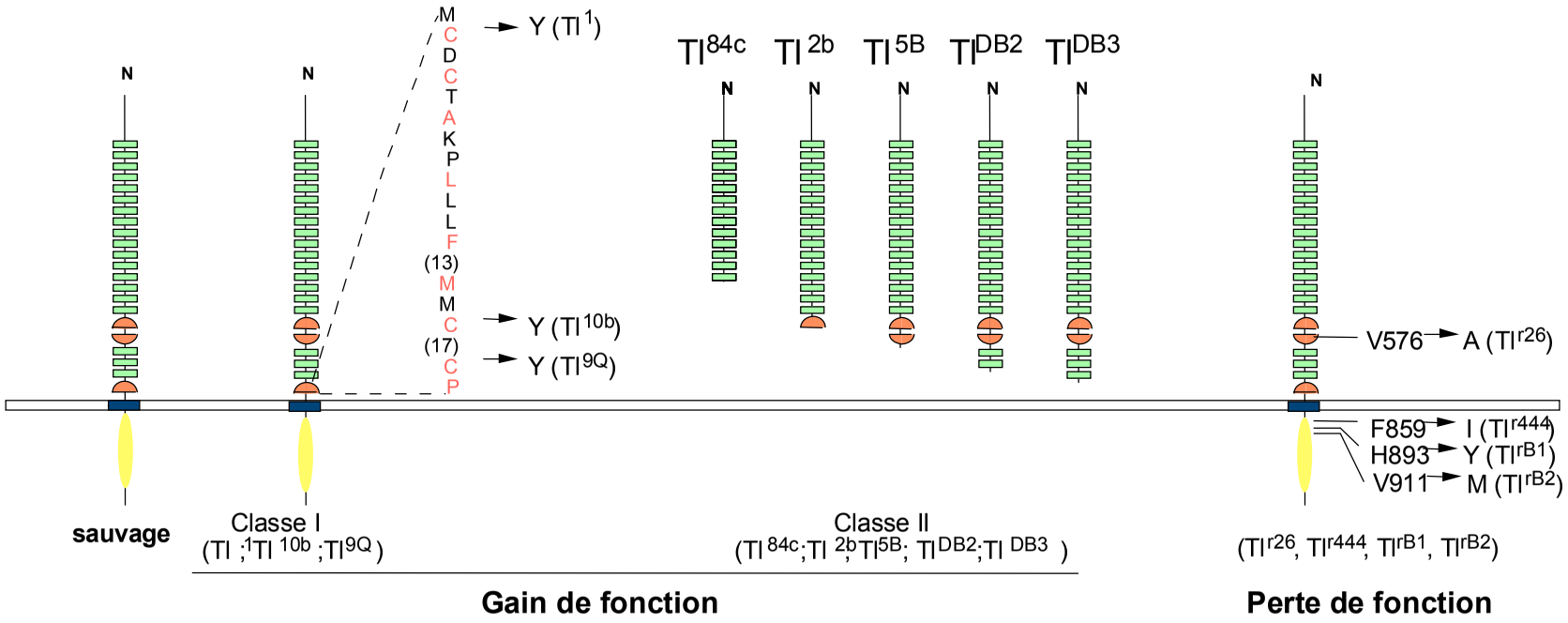


Figure 15. Structure des produits des allèles gain de fonction (induisant la ventralisation de l'embryon) ou perte de fonction (induisant la dorsalisation de l'embryon) de *Toll*, isolés lors d'un crible de mutagénèse saturante du troisième chromosome chez la drosophile (Schneider *et al*, 1991). Les allèles gain de fonction de classe I sont dominants, alors que les allèles de classe II requièrent une copie sauvage de *Toll* pour induire la ventralisation.

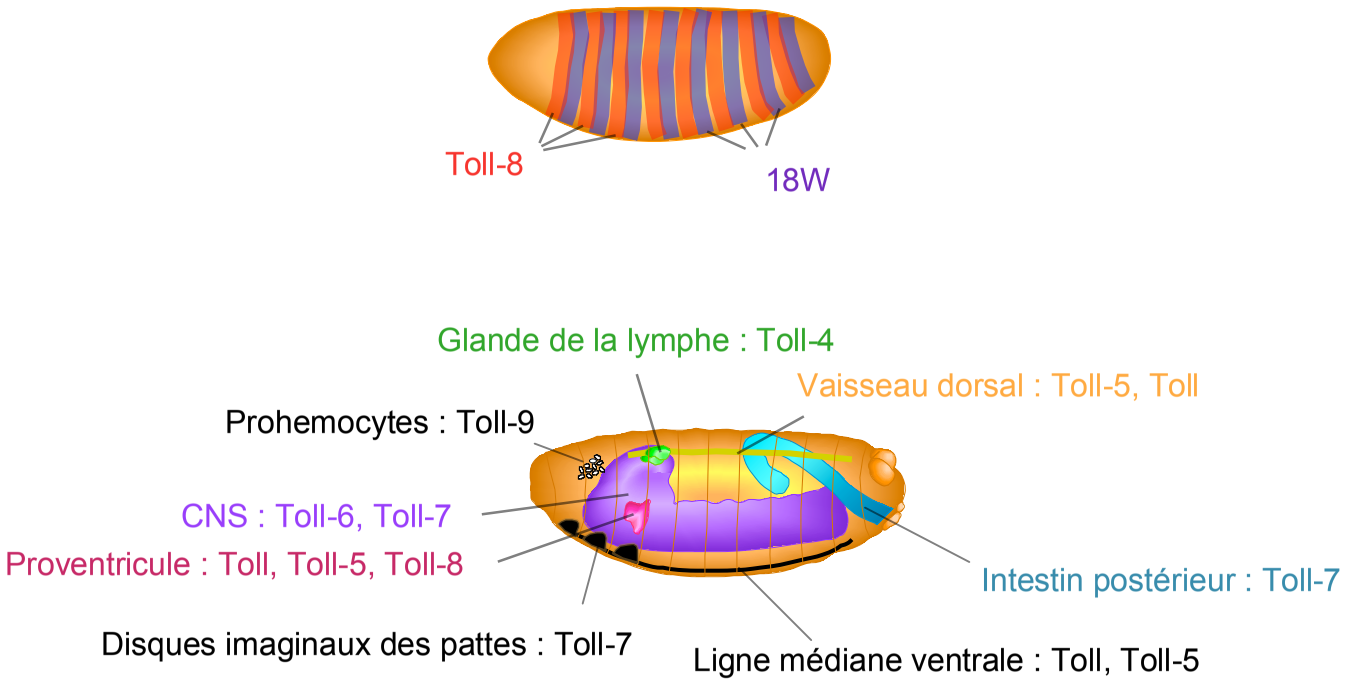


Figure 16. Profil d'expression dynamique et tissus-spécifique des Tolls dans l'embryon, d'après Kambris *et al.* 2002.

mêmes tissus que Toll. Les récepteurs Toll-7, Toll-8 et 18w sont également exprimés dans les mêmes groupes de cellules ou dans des cellules adjacentes (Kambris et al., 2002). Ces résultats suggèrent que les domaines extracellulaires de différents Tolls pourraient être impliqués dans des interactions cellulaires, à la manière des protéines Tartan et Capricious mentionnées ci-dessus, qui participent à la mise en place de la polarité dorsoventrale dans le développement de l'aile (Milan et al., 2001).

Une autre famille de protéines possédant des motifs NF et CF est constituée des récepteurs Trk de neurotrophines (NT). Les récepteurs TrkA, TrkB et TrkC sont impliqués dans le développement et la maintenance du système nerveux central et périphérique (Schneider and Schweiger, 1991). Il a été montré que les motifs LRR interviennent dans la liaison des neurotrophines aux récepteurs murins TrkA et TrkB ainsi qu'à l'homologue de TrkC chez la limnée (Windisch et al., 1995) (van Kesteren et al., 1998) (Ninkina et al., 1997). Le fait que les récepteurs Trk possèdent un motif NF est intéressant car les neurotrophines font partie de la famille des facteurs de croissance à nœud de cystéine, comme Spätzle, le ligand de Toll (Mizuguchi et al., 1998) (Figure 17). Les récepteurs Toll-2 à -8 chez la drosophile pourraient donc fonctionner comme des récepteurs de molécules apparentées à Spätzle. Il existe en effet une famille de cinq protéines apparentées à Spätzle chez la drosophile (Parker et al., 2001) (Figure 17b). Ces protéines pourraient représenter les équivalents des neurotrophines chez la drosophile. A ce sujet, il est intéressant de noter que Toll-6 et –7 sont exprimés dans des cellules du système nerveux central au cours du développement embryonnaire et dans une classe de neurones (Kambris et al., 2002). De plus, Toll est impliqué dans le développement des motoneurones (Halfon et al., 1995). Enfin, une étude récente montre que Toll-8 est impliqué dans la glycosylation de certaines glycoprotéines neurales dans l'embryon de drosophile (Seppo et al., 2003). Même si l'importance du domaine NF (ou des LRRs) dans l'interaction avec les neurotrophines reste à établir, la présence de ce domaine dans les Tolls pourrait être liée à leur capacité à interagir avec des molécules apparentées à Spätzle.

L'absence de motif NF chez les TLRs pourrait être corrélée au fait que, pour la plupart, ils sont impliqués dans la réponse à des inducteurs non protéiques comme le LPS, le PGN et le dsRNA (pour revue (Akira and Hemmi, 2003). Les exceptions à ce jour sont la flagelline, qui active TLR5, et certaines protéines de l'hôte comme

HSP60, HSP96 (Vabulas et al., 2002), HSP70 (Vabulas et al., 2002) (Asea et al., 2002), le domaine EDA de la Fibronectine (Okamura et al., 2001), le Fibrinogène (Smiley et al., 2001), la protéine surfactante collectine A (SP-A) du poumon (Guillot et al., 2002), et la □defensin-2 de souris (Biragyn et al., 2002), qui activent TLR4. Une interaction directe entre ces protéines et les TLRs reste cependant à démontrer.

I. 1. b. Les motifs C-flank.

Contrairement aux TLRs et à Toll-5 et Toll-9 qui ne possèdent qu'un motif CF juxtaposé à la membrane plasmique, les Tolls possèdent deux à trois motifs CF qui compartimentent les répétitions LRRs (Figure 4). Les ectodomaines des récepteurs Toll de *A. gambiae* et *A. Aegypti* présentent également des motifs riches en cystéines répartis entre plusieurs répétitions LRR (Luna et al., 2002) (Luna et al., 2003) (Christophides et al., 2002). Il semble que peu de protéines à LRR présentent ainsi des compartiments délimités par les motifs NF et CF. C'est cependant le cas pour la protéine d'adhésion extracellulaire Slit (Rothberg et al., 1990). De la même façon que pour le motif NF, il a été montré que les quatre cystéines du motif CF sont impliquées dans des ponts disulfures (Schneider et al., 1991). Dans le cas de la protéine plaquettaire humaine GpIb□, il est établi que ces quatre cystéines sont impliquées dans deux ponts disulfures conférant au motif une structure à double boucle (Hess et al., 1991) (Figure 3c). L'importance fonctionnelle des motifs CF est montrée par le fait qu'il existe trois mutants gain de fonction Tl^{10b}, Tl^{1} et Tl^{9Q}, résultant du changement en tyrosine d'une cystéine du motif CF proche de la membrane (Schneider et al., 1991) (Figure 15). Le motif CF semble donc avoir un rôle structural et/ou fonctionnel important. Dans le cas du récepteur GpIb□, il a été montré qu'un motif CF est compris dans le site de liaison au ligand, le facteur de von Willebrand (Vicente et al., 1990).

Malgré l'importance de ce motif chez Toll, il ne semble pas être impliqué directement dans l'interaction avec Spätzle. En effet, le mutant Tl^{84c}, uniquement composé des 13 LRRs amino-terminaux de Toll et dépourvu de motifs NF ou CF, est capable d'induire la ventralisation de l'embryon à condition qu'une copie sauvage de Toll soit présente de façon trans-hétérozygote (Schneider et al., 1991). Ce mutant semble donc capable de se lier à Spätzle et de le transporter du côté dorsal de l'embryon. Nous montrons en outre dans la troisième partie des résultats que le mutant $Toll^{5b}$, dépourvu du motif CF adjacent à la membrane, fixe aussi bien Spätzle

que le domaine extracellulaire de Toll entier. Le ou les motifs CF pourraient intervenir dans un autre aspect de l'activation de Toll, par exemple la dimérisation. Nous avons en effet montré que Spätzle se fixe à un dimère de Toll et qu'un mutant de Toll dépourvu du domaine intracytoplasmique se comporte comme un dominant négatif. Ceci suggère que la dimérisation de Toll active le récepteur. Le motif CF pourrait être impliqué dans cette dimérisation.

Pour en savoir plus sur la signification des différences entre les ectodomaines des Tolls et des TLRs, il faudrait maintenant procéder à des études structure-fonction des Tolls, en particulier des domaines NF et CF :

(i) Il faudrait d'abord cristalliser l'ectodomaine du récepteur Toll. En effet, des protéines à LRRs ont déjà été cristallisées et leur structure a été étudiée, mais il s'agit de protéines qui ne présentent pas de motifs NF ou CF (pour revue (Kobe and Kajava, 2001)) . La structure de l'ectodomaine de Toll permettrait d'élucider le rôle des motifs NF et CF, et de comprendre les mécanismes de liaison à Spätzle ou de dimérisation.

(ii) En parallèle, nous avons, dans ce travail, mis au point un test permettant d'étudier facilement la fonction du domaine extracellulaire de Toll, en présence de protéine recombinante SpzC106. Il est maintenant possible de construire des vecteurs d'expression codant pour des versions mutées de Toll (délétion des domaines NF ou CF, permutation avec les domaines correspondant aux autres récepteurs Toll, etc…), afin de mettre en évidence les acides aminés ou régions nécessaires à l'activation et à la signalisation par le récepteur.

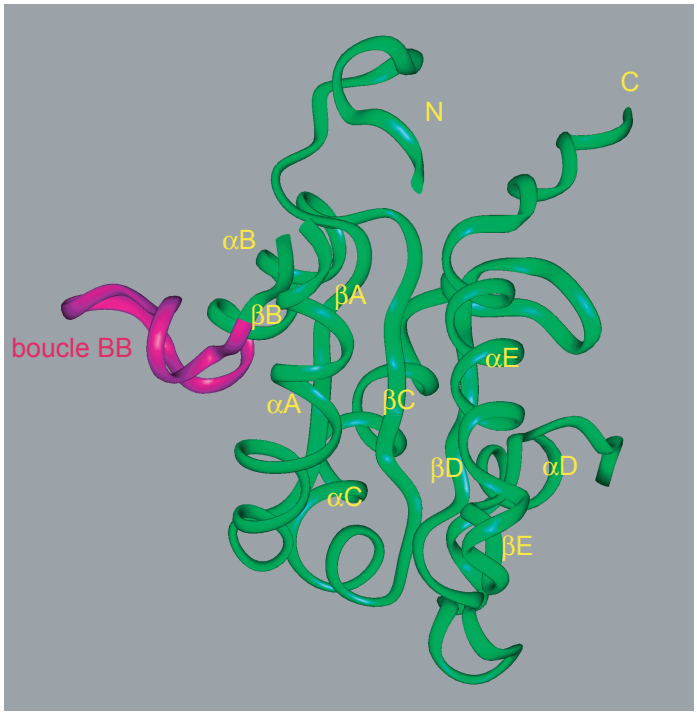
I. 2. Diversité au niveau du domaine TIR.

Le domaine TIR, même s'il est mieux conservé que l'ectodomaine, présente lui aussi des différences entre les Tolls et les TLRs. Il est partagé par les récepteurs Toll et le récepteur de l'IL-1 et est à la fois présent dans des protéines de plantes et de mammifères. Ce motif remonte donc aux origines de la vie eucaryote, ce qui signifie qu'il a dû apparaître il y a un ou deux milliards d'années. D'ailleurs, au niveau

structural, le domaine TIR ressemble au facteur CheY impliqué dans la transduction de signal chez les bactéries (Xu et al., 2000)). L'étude phylogénétique des récepteurs apparentés à Toll dans les différentes espèces montre que le domaine TIR est très fortement conservé. Par exemple, si l'on compare les séquences de TLR2 chez *Homo sapiens* et TLR2 chez *Gallus gallus*, sachant que la spéciation à l'origine de ces deux espèces date de 310 millions d'années, on observe que seulement 19,5% des résidus du domaine TIR ont été modifiés (Beutler and Rehli, 2002). Notre étude de phylogénie fondée sur ce domaine TIR, montre que 8 des 9 Tolls de drosophile forment un groupe séparé de celui qui regroupe les TLRs. Là encore, Toll-9 se distingue en étant phylogénétiquement plus proche des TLRs (Figure 7). Le domaine TIR des TLRs est cependant plus proche de celui des Tolls que de celui des membres de la famille du récepteur de l'IL-1. Cette observation suggère que les Tolls et les TLRs ont un ancêtre commun qui contient un domaine TIR mais que les deux familles ont ensuite évolué indépendamment l'une de l'autre, peut-être pour remplir des tâches différentes, liées à l'immunité pour les TLRs et au développement pour les Tolls. Chez les TLRs, une fonction primordiale du domaine TIR est de permettre l'interaction homophile avec le domaine TIR de l'adaptateur MyD88. L'homologue de ce facteur chez la drosophile, DmMyD88, interagit avec le domaine TIR de Toll-9, qui ressemble fortement au domaine TIR de certains TLRs. Nous n'avons, en revanche, pas détecté d'interaction entre DmMyD88 et les autres Toll, à l'exception de Toll lui-même. Ce résultat concernant Toll-2 à –8 est conforme à notre étude de phylogénie, et indique que les domaines TIR des Tolls et des TLRs fonctionnent différemment. Le cas de Toll lui-même est plus surprenant : soit le domaine TIR de Toll a gardé certaines caractéristiques structurales des TLRs qui lui permettent de recruter DmMyD88, soit il a acquis indépendamment des TLRs la capacité de recruter DmMyD88.

La cristallisation du domaine TIR de TLR1 et de TLR2 a permis d'observer que, malgré une forte identité de séquence entre les deux domaines (50%), les différences structurales sont importantes (Xu et al., 2000) (Figure 18). Cette observation suggère que les autres domaines TIR, dont les séquences présentent entre 20 et 30% d'identité en moyenne et sont de longueurs variables, doivent présenter une importante diversité structurale. Cette diversité traduit sans doute la nécessité pour les différents récepteurs de recruter différents adaptateurs afin d'induire plusieurs voies de signalisation. Ces complexes associant récepteurs et

a.



b.

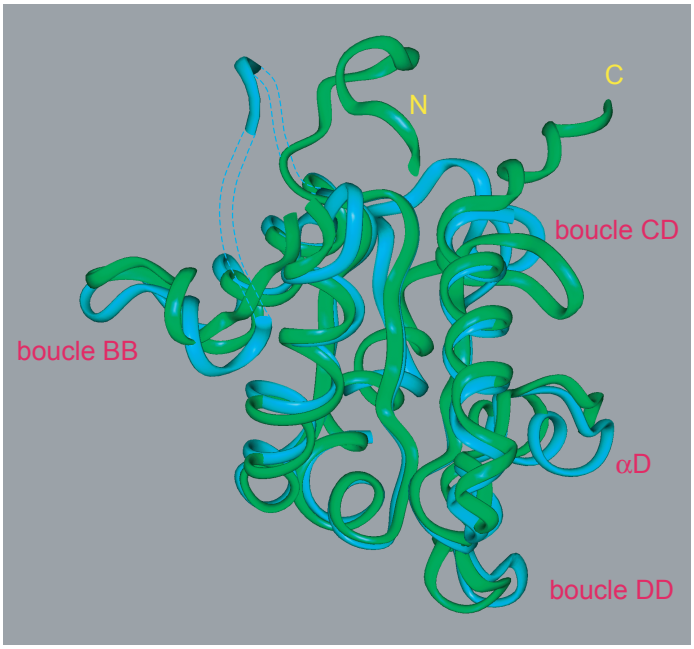


Figure 18. Structure du domaine TIR d'après Xu *et al* 2000. a. Représentation de la structure du domaine TIR de TLR2. Les feuillets β (βA, βB, βC, βD et βE) et les hélices α (αA, αB, αC, αD et αE) sont indiqués en jaune et la boucle BB en rose. Selon la nomenclature, la boucle BB relie le feuillet βB et l'hélice αB. Cette boucle semble impliquée dans l'interaction avec MyD88 ou une autre protéine à domaine TIR. **b.** Superposition des structures des domaines TIR de TLR1 (en vert) et de TLR2 (en bleu). Les régions présentant de grandes différences entre les deux structures sont indiquées.

adaptateurs vont diriger la réponse à un agoniste précis vers les gènes cibles adaptés et dans un type de cellule donné. Des études récentes confirment cette hypothèse, de nouveaux adaptateurs requis par les différents TLRs en réponse à différents ligands ont été identifiés :

- TIRAP/MAL est un cofacteur de MyD88 dans la voie de transduction induite par TLR4 et TLR2 (Horng et al., 2002) (Yamamoto et al., 2002a). La fonction de TIRAP/MAL s'apparente donc à celle de Tube chez la drosophile, qui est nécessaire en aval de DmMyD88 pour activer Pelle. Il est intéressant de noter à ce sujet que TIRAP/MAL contient un domaine TIR, alors que Tube contient un Death Domain (DD). Cette différence pourrait être liée à l'observation que le domaine DD de DmMyD88 a un effet négatif dominant dans les cellules de drosophile, alors que c'est le domaine TIR de MyD88 qui a cette propriété chez les mammifères.
- TICAM-1/TRIF semble induire l'activation de IRF-3 (Interferon regulatory factor 3), indépendamment de MyD88 en s'associant à TLR3 (Oshiumi et al., 2003) (Yamamoto et al., 2002b).

Nos résultats soulèvent la question de la fonction du domaine TIR des récepteurs Toll de drosophile qui n'activent pas les promoteurs Rel-dépendants des peptides antimicrobiens (18w, Toll-3, -4, -6, -7, -8). Ces récepteurs pourraient recruter un autre adaptateur à domaine TIR ou activer une voie de signalisation complètement différente. Une telle hypothèse est confortée par le fait que les plantes ne semblent pas contenir de facteur de transcription de type NF-□B, bien qu'elles expriment de nombreuses protéines à domaine TIR (2000). De même, le nématode *C.elegans* contient un récepteur Toll, mais pas de protéine NF-□B, ou d'homologue de MyD88 (Pujol et al., 2001). Il sera donc intéressant d'identifier les cibles transcriptionnelles des récepteurs 18w, Toll-3, -4, -6, -7, -8, par exemple en analysant l'expression des gènes des mouches transgéniques exprimant des versions gain-de-fonction de ces récepteurs à l'aide de puces à ADN.

I. 3. Conclusions et perspectives.

Nos données montrent qu'il existe deux sous-familles de récepteurs Toll, qui ont évolué indépendamment l'une de l'autre. La sous-famille des récepteurs Toll, qui comprend, outre Toll lui-même, 18w, Toll-3, -4, -5, -6, -7 et Toll-8 chez la drosophile, semble jouer un rôle dans le développement plutôt que dans la défense de l'hôte. Des données génétiques récentes confirment ceci : en effet, des mouches mutantes pour 18W ou Toll-8 montrent la même susceptibilité à l'infection pour des bactéries ou des champignons que les mouches sauvages ((Ligoxygakis et *al.*, 2002) et Maria Capovilla, données non publiées). Visiblement, seul Toll a un rôle important dans la réponse immunitaire. Cette fonction est cependant différente de celle des TLRs, puisque nous avons montré que Toll fonctionne comme un récepteur de cytokine. Ces données suggèrent que le rôle de Toll dans la réponse immunitaire pourrait correspondre à une évolution par convergence, coïncidant avec l'acquisition par Toll de la capacité d'interagir avec DmMyD88. La sous-famille des TLRs semble, quant à elle, spécifiquement impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire innée. En particulier, l'inactivation des TLRs (1, 2, 3, 4, 6, 7, 9) par recombinaison homologue chez la souris n'entraîne pas de phénotype développemental (Takeuchi et al., 2002), (Takeuchi et al., 1999), (Alexopoulou et al., 2001), (Poltorak et al., 1998), (Takeuchi et al., 2001), (Hemmi et al., 2002), (Hemmi et al., 2000).

Le gène *Toll-9* représente une exception, puisqu'il possède des caractéristiques structurales qui le rapprochent des TLRs de mammifères, que ce soit dans son ectodomaine qui contient un seul motif CF et pas de motif NF, ou dans son domaine TIR fortement similaire à celui des TLR1, 2, 6 et 10. L'étude du gène *Toll-9* devrait permettre de mieux comprendre la fonction ancestrale de cette importante famille de récepteurs. Nous avons récemment identifié deux lignées de drosophiles contenant des transposons insérés dans le gène *Toll-9*. Ces mouches sont en cours d'analyse pour vérifier que l'insertion des transposons inactive le gène *Toll-9* et, le cas échéant, pour analyser leur phénotype. En outre, des lignées transgéniques que nous avons établies permettent d'exprimer une version constitutivement active de Toll-9. Elles seront exploitées pour identifier les gènes cibles induits par Toll-9, en utilisant la

technique des puces à ADN. Il sera particulièrement intéressant de comparer les gènes induits par Toll et Toll-9, qui activent tous les deux la synthèse de la Drosomycine.

II. Reconnaissance du non-soi et activation de la réponse immunitaire innée chez la drosophile.

Les résultats obtenus par de nombreuses équipes au cours des cinq dernières années ont permis d'établir que les TLRs jouent un rôle de sentinelle et détectent différentes familles de molécules microbiennes. L'activation des TLRs conduit à l'induction de plusieurs cytokines dont l'Interleukine-1 (IL-1). Ainsi que mentionné ci-dessus, il apparaît que les Tolls de drosophile fonctionnent différemment des TLRs, et ne semblent pas impliqués directement dans la reconnaissance du non-soi. Des résultats obtenus par d'autres équipes, notamment au sein de notre laboratoire, permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance du non-soi et l'activation de la réponse immunitaire chez la drosophile.

II. 1. Reconnaissance des bactéries à Gram-positif et des champignons. Activation de la voie Toll.

Le fait que Spätzle soit clivé dans les minutes qui suivent une blessure septique, ainsi que l'expression constitutive de la Drosomycine dans les mutants *nec* affectant le gène de la serpine 43AC indiquent que les infections fongiques et bactériennes à Gram-positif activent une ou des sérines protéases (Levashina et al., 1999). Deux cribles indépendants menés par les équipes de Julien Royet et Jean-Marc Reichhart dans notre Unité ont permis d'identifier une molécule de reconnaissance et une sérine protéase agissant en amont de Spätzle.

Lors d'un crible génétique, l'équipe de Julien Royet au laboratoire a généré une lignée présentant une mutation dans le gène *seml* (Michel et al., 2001). Le gène *seml* code un facteur de reconnaissance du peptidoglycane (PGN), PGRP-SA. Le génome de la drosophile contient une famille d'une dizaine de gènes codant des PGRPs courts (forme S) ou longs (formes L). Les PGRPs courts ont un peptide signal et sont donc probablement sécrétés comme le PGRP-SA. La localisation cellulaire des PGRP longs est encore incertaine mais trois d'entre eux présentent un domaine transmembranaire putatif (PGRP-LA, LC et LD) (Werner et al., 2000). Les

mouches de la lignée *seml* résistent normalement à des infections bactériennes à Gram-négatif. Elles résistent également à des infections fongiques, mais, de façon surprenante, elles sont spécifiquement sensibles à des infections bactériennes à Gram-positif. En réponse à ce type d'infection, l'expression de la *drosomycine* est abolie. Il s'agit de la première caractérisation d'un mutant capable d'induire la voie Toll en distinguant la réponse aux infections fongiques et aux bactéries à Gram-positif. Ce résultat suggère qu'il existe une ramification de la voie Toll en amont de Spätzle, avec une voie de reconnaissance des bactéries à Gram-positif, impliquant PGRP-SA, et une voie de reconnaissance des champignons (Figure 2).

Ce résultat a été confirmé par un autre crible mené par Jean-Marc Reichhart et Petros Ligoxygakis, visant à identifier des suppresseurs de la mutation *nec*. Les mouches mutantes pour *nec* meurent rapidement après éclosion, ce qui fournit un crible commode pour isoler des suppresseurs. A l'issue d'un crible de 9700 lignées, le mutant *persephone* (*psh*) a été isolé. Les mouches mutantes pour *nec* et *psh*, simultanément, n'expriment plus la Drosomycine de façon constitutive, indiquant que *psh* agit dans la voie Toll, en aval de *nec*. De façon tout à fait intéressante, les mouches déficientes pour *psh* présentent un phénotype complémentaire à celui des mouches déficientes pour *seml* ; en effet, les mouches déficientes pour *psh* meurent rapidement en réponse à une infection fongique mais sont résistantes à des infections bactériennes à Gram-positif (Ligoxygakis et al., 2002a). Il résulte de ces résultats un modèle dans lequel des molécules de reconnaissance distinctes détectent l'infection par des bactéries à Gram-positif (PGRP-SA) et des champignons (molécule restant à identifier). Ces molécules de reconnaissance activent ensuite des sérines protéases distinctes (Psh dans le cas des infections fongiques et une protéase qu'il reste à identifier dans le cas des infections bactériennes à Gram-positif) (Figure 2). Il est probable que ces sérines protéases activent la protéase qui clive Spätzle et convertit le précurseur inactif en ligand de Toll. Il est intéressant de noter qu'un mécanisme similaire de cascades protéolytiques activées par différents agents infectieux a été bien décrit chez la limule. En effet, des études biochimiques ont montré que le LPS des bactéries à Gram-négatif et le □-1,3-glucan des champignons sont reconnus dans l'hémolymphe de la limule par les facteurs C et G, respectivement. L'activation des facteurs C et G induit une cascade protéolytique qui aboutit au clivage du Coagulogène (Figure 19). Le Coagulogène est ainsi activé et devient la Coaguline qui forme une structure gélifiée insoluble empêchant la

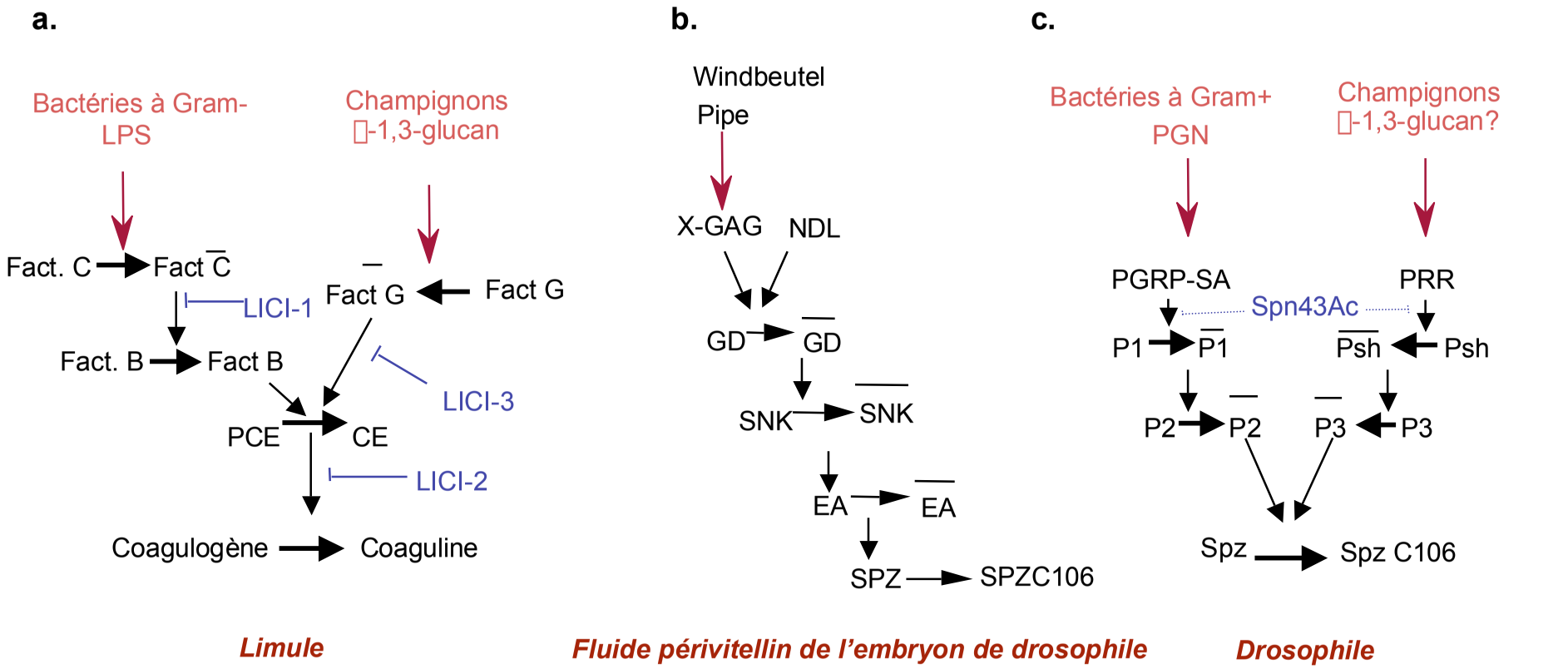


Figure 19. Cascades protéolytiques activant Spätzle chez la drosophile et la molécule apparentée, le Coagulogène chez la limule. a. Activation de la coagulation sanguine chez la limule. Les zymogènes facteurs C et G sont activés par différents PAMPs. La transformation de la proclotting enzyme (PCE) en clotting enzyme (CE) aboutit au clivage du Coagulogène et à la formation de Coaguline. Les serpines LICI-1, -2 et -3 contrôlent la cascade protéolytique. **b.** Cascade protéolytique aboutissant au clivage de Spätzle lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral de la drosophile (**cf fig 1**). GAG : glucosaminoglycan, NDL : Nudel, GD : Gastrulation defective, SNK : Snake, EA : Easter, SPZ : Spätzle. **c.** Activation de Spätzle dans les drosophiles adultes en réponse à une infection. La reconnaissance de PAMPs issus de bactéries à Gram-positif par PGRP-SA induit l'activation d'une protéase P1 non identifiée et, directement ou indirectement, le clivage de Spätzle qui engendre le fragment actif SPZC106. La reconnaissance d'autres PAMPs issus de champignons active la protéase Persephone (Psh) qui induit le clivage de Spätzle, sans doute par l'intermédiaire d'une autre protéase. Dans les mouches portant la mutation dans le gène *nec*, qui code la serpine Spn43AC, Spätzle existe constitutivement sous sa forme clivée SPZC106.

propagation des pathogènes à l'intérieur du système circulatoire de la limule (Muta and Iwanaga, 1996) (Bergner et al., 1996a). La cascade protéolytique implique le facteur G et la Proclotting enzyme qui présentent des similarités structurales avec les protéases Snake, Easter et Psh. L'activité de ces protéases est, en outre, étroitement régulée par des serpines apparentées au produit du gène *nec*, la serpine 43AC (Muta and Iwanaga, 1996).Ces ressemblances montrent que l'activation de la réponse immunitaire par une cascade protéolytique est particulièrement propice au contrôle de la prolifération des pathogènes chez les invertébrés. En outre, la détermination de la structure tridimensionnelle du Coagulogène a permis de montrer que cette molécule faisait partie de la même famille structurale que les neurotrophines, comme Spätzle (Bergner et al., 1996b). On peut donc penser que le module de signalisation, basé sur des protéines de reconnaissance qui activent des cascades protéolytiques menant à l'activation de molécules structurellement apparentées aux neurotrophines, a été conservé chez les Invertébrés.

II. 2. La fonction de Toll chez la drosophile est similaire à celle du récepteur de l'IL-1 chez les mammifères.

Dans cette étude, nous avons montré que la reconnaissance des bactéries à Gram-positif et des champignons induit une cascade protéolytique aboutissant au clivage du précurseur de Spätzle. Cette protéine s'apparente structuralement aux facteurs de croissance de vertébrés et se comporte, par ailleurs, comme une cytokine. En effet, une fois clivé, Spätzle se lie à Toll et induit la voie de transduction qui aboutit à la transcription des gènes cibles dont le peptide antifongique Drosomycine. Bien que Spätzle soit structuralement différente de l'IL-1, il est possible d'établir un parallèle entre les fonctions de ces deux cytokines (Figure 20). La réponse innée peut se décomposer en une phase de reconnaissance, une phase de communication intercellulaire et d'amplification impliquant des cytokines, et une phase de transduction du signal menant à la production de molécules effectrices antimicrobiennes grâce à l'activation de protéines Rel. Chez les mammifères, un mécanisme de reconnaissance implique les TLRs exprimés à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. L'activation des TLRs induit la

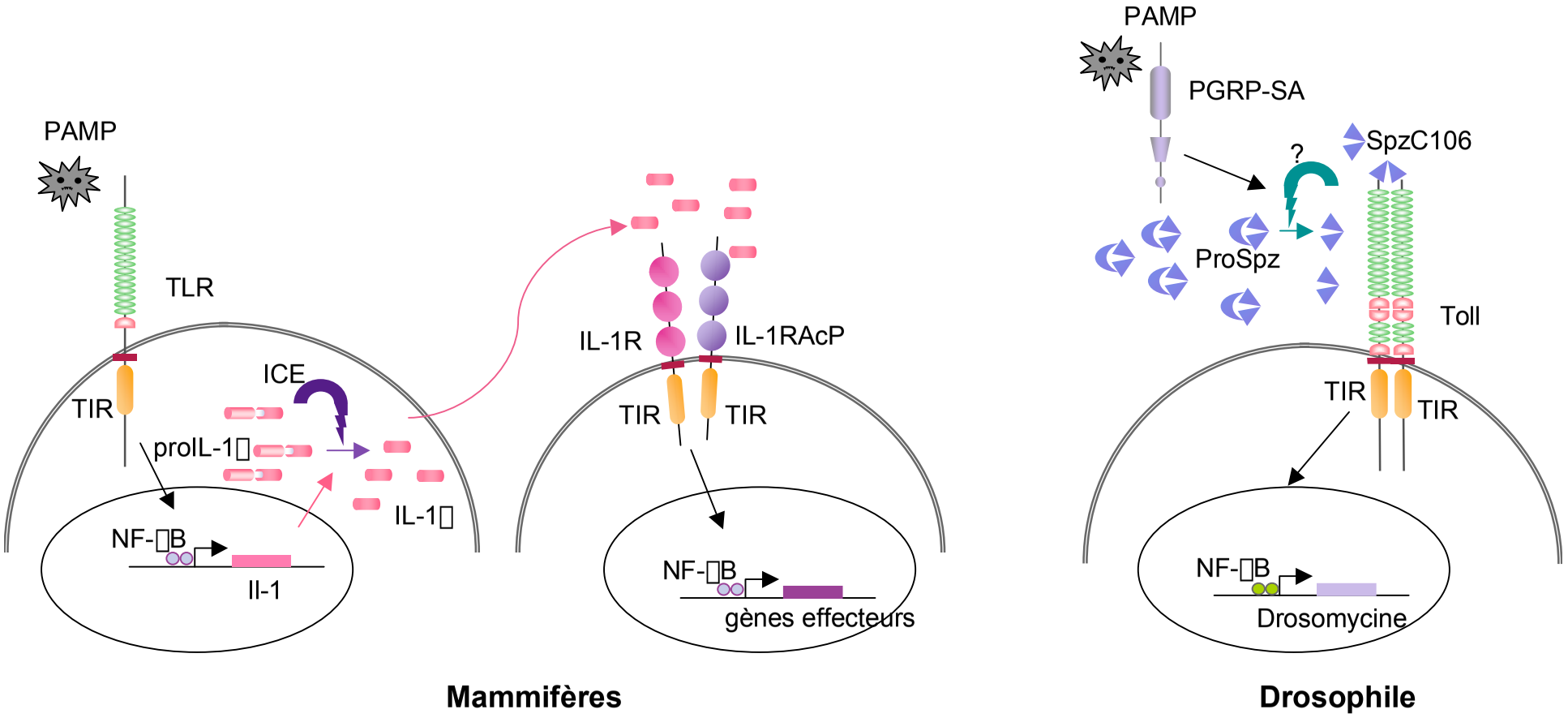


Figure 20. Activation de l'expression d'un peptide antimicrobien induite par une cytokine chez les mammifères et la drosophile. Chez les mammifères, les PAMPs sont reconnus par les TLRs qui induisent la production de proIL-1. La caspase ICE (IL-1 converting enzyme) clive proIL-1. La cytokine activée amplifie la réponse par l'activation de son récepteur, IL-1R qui possède un domaine TIR, comme Toll. L'activation de la voie IL-1R conduit à la transcription de nombreux gènes effecteurs dont celui qui code le peptide antimicrobien HBD-2. Chez la drosophile, les PAMPs sont reconnus par des PRRs solubles et circulants comme le PGRP-SA, supposés activer des cascades protéolytiques, qui amplifient le signal. Une telle cascade protéolytique aboutit au clivage de Spätzle (Spz), générant un fragment actif (SpzC106) qui se lie à Toll et induit sa dimérisation. L'activation de la voie Toll induit la transcription du peptide antifongique Drosomycine.

translocation nucléaire du facteur de transcription à domaine Rel, NF-□B, la synthèse et la sécrétion d'IL-1□. Comme Spätzle, cette cytokine est activée par clivage protéolytique, même s'il s'agit dans ce cas d'une caspas et non d'une sérine protéase. L'IL-1□, en se fixant à son récepteur à domaine TIR, induit la synthèse de nombreuses molécules antimicrobiennes et notamment de la □-défensine (HBD-2) (voir par exemple (Liu et al., 2003)). Chez les invertébrés, l'exemple de la drosophile et de la limule montre l'importance des molécules de reconnaissance circulantes, comme les PGRP-S, et de l'amplification du signal par des cascades de protéases. Le fait que les organes de ces animaux baignent dans l'hémolymphe pourrait expliquer l'efficacité de cette stratégie. La fixation de Spätzle à son récepteur à domaine TIR, Toll, entraîne ensuite l'activation de la protéine à domaine Rel, Dif, et la production du peptide antimicrobien Drosomycine. Sur la base de cette comparaison, on peut suggérer que les fonctions similaires de Toll et du récepteur de l'IL-1 résultent d'une évolution convergente vers une fonction commune : permettre la synthèse de molécules effectrices en réponse à un signal diffusible (i.e. cytokine), relayant et amplifiant l'information reçue par les PRRs.

II. 3. Reconnaissance des bactéries à Gram-négatif.

La découverte de la fonction de PGRP-SA a mis en lumière la famille des PGRPs. Elle a en particulier amené les équipes de Julien Royet et Dominique Ferrandon à chercher des mutants d'autres gènes de cette famille, et ceci leur a permis d'identifier des mutants dans le gène codant pour PGRP-LC. Ces mutants résistent normalement aux infections par les champignons et les bactéries à Gram-positif. Cependant, ils sont sensibles aux infections par les bactéries à Gram-négatif, et présentent un phénotype similaire à celui des mutants de la voie IMD (Gottar et al., 2002). Deux cribles indépendants menés par les groupes de K. Anderson à New York et A. Ezekowitz à Boston ont également montré que PGRP-LC joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la Diptéricine (Choe et al., 2002) (Ramet et al., 2002). PGRP-LC serait un PRR transmembranaire impliqué dans la réponse aux bactéries à Gram-négatif. Il n'est cependant pas exclu que PGRP-LC dispose d'un corécepteur. En effet, le phénotype d'un mutant nul pour PGRP-LC est

moins fort que celui d'autres mutants nuls de la voie IMD, ce qui laisse à penser que d'autres molécules interviennent, avec lui, à la surface des cellules, dans l'activation de la voie IMD (Gottar et al., 2002). Un troisième PGRP, PGRP-LE, semble également impliqué dans la réponse immunitaire. En effet, la surexpression de PGRP-LE dans la larve induit l'activation de la voie IMD et la cascade de la prophénoloxidase (Takehana et al., 2002). Des études biochimiques *in vitro* ont montré que PGRP-LE se lie spécifiquement au peptidoglycane de type «diaminopimelic acid» (DAP-PGN) et pas au peptidoglycane de type «Lysine» (Lysine-PGN). DAP-PGN et Lysine-PGN diffèrent par leur séquence en acide aminés. Ce résultat reste à confirmer *in vivo,* d'une part dans un mutant perte de fonction pour PGRP-LE et d'autre part, avec un plus large spectre de bactéries à Gram-positif et négatif contenant du DAP-PGN.

Sur la base de ces données, on peut penser que les PGRPs jouent un rôle similaire à celui des TLRs chez les mammifères, et activent la réponse immunitaire en réaction à différentes molécules ou motifs moléculaires, spécifiques de microorganismes infectieux. Il est cependant probable que d'autres molécules que les PGRPs interviennent dans la détection du non-soi infectieux chez la drosophile, soit en tant que molécules accessoires des PGRPs (à la manière de MD-2, CD14 ou LPB chez les mammifères), soit en tant que PRR à part entière. L'un de ces récepteurs pourrait être Toll-9 puisqu'il est structurallement apparenté aux TLRs.

Une autre famille de PRRs potentiels a été identifiée récemment chez la drosophile : la famille des GNBP (Gram-negative bacteria-binding protein). Cette famille est composée de trois membres dont seul DGNBP-1 a été caractérisé (Kim et al., 2000). Cette protéine est présente chez la drosophile sous forme soluble ou liée à la membrane par une liaison GPI (glycosylphosphatidylinositol). Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que DGNBP-1 se lie au □-1,3-glucan de champignons et au LPS, ce qui induit l'expression des peptides antimicrobiens en réponse, dans les cellules S2. Ces résultats suggèrent que DGNBP-1 pourrait avoir un rôle de corécepteur semblable à celui joué par CD14 chez les mammifères.

La famille des Scavenger recepteurs (SR) pourrait également intervenir. En particulier, il a été suggéré que le récepteur transmembranaire dSR-CI est impliqué dans la phagocytose des bactéries *E. coli* et *S. aureus*, mais pas de la levure *C. silvatica* dans les cellules de type macrophage S2 (Ramet et al., 2001). Cependant,

si l'expression de dSR-CI est nécessaire à la phagocytose, elle n'est pas nécessaire à l'induction des peptides antimicrobiens.

En conclusion, les Tolls de drosophile diffèrent des TLRs de mammifères à la fois structuralement et fonctionnellement. De façon plus générale, les mécanismes de reconnaissance diffèrent plus qu'on n'aurait pu l'imaginer, il y a quelques années, lors de la découverte des récepteurs TLRs chez les mammifères. Cette diversité traduit probablement le fait que chaque organisme fait face à des pathogènes dont le cycle de reproduction ou de mutation est extrêmement rapide, ce qui leur permet de contourner ou d'échapper aux réponses de l'hôte. Il apparaît donc que les voies de signalisation n'ont pas été conservées dans leur intégralité, comme cela peut-être le cas pour des voies régulant la différenciation ou la prolifération cellulaire en réponse à des signaux développementaux, mais que ce sont des «modules moléculaires» qui ont été conservés, et intégrés dans différentes voies de signalisation pour répondre le plus efficacement possible aux signaux d'infection. L'activation de cascades protéolytiques par des PRRs solubles, menant à la production de substrats activés apparentés aux neurotrophines, ou le complexe récepteur transmembranaire à domaine TIR / adaptateur MyD88 / kinase IRAK sont des exemples de ces modules (Figure 21). Au cours de l'évolution, ces modules ont vraisemblablement été cooptés dans différentes voies de signalisation. Ce mécanisme de brassage des modules pourrait expliquer que le module TAK / IKK□ / IKK□ soit impliqué dans la voie TLR / IL-1R chez les mammifères, et la voie IMD chez la drosophile. Le module liant le complexe récepteur Toll au module I□B / NF-□B reste inconnu. Son identification permettra peut-être de mettre en évidence un nouvel aspect intéressant des voies de signalisation inflammatoires chez les mammifères.

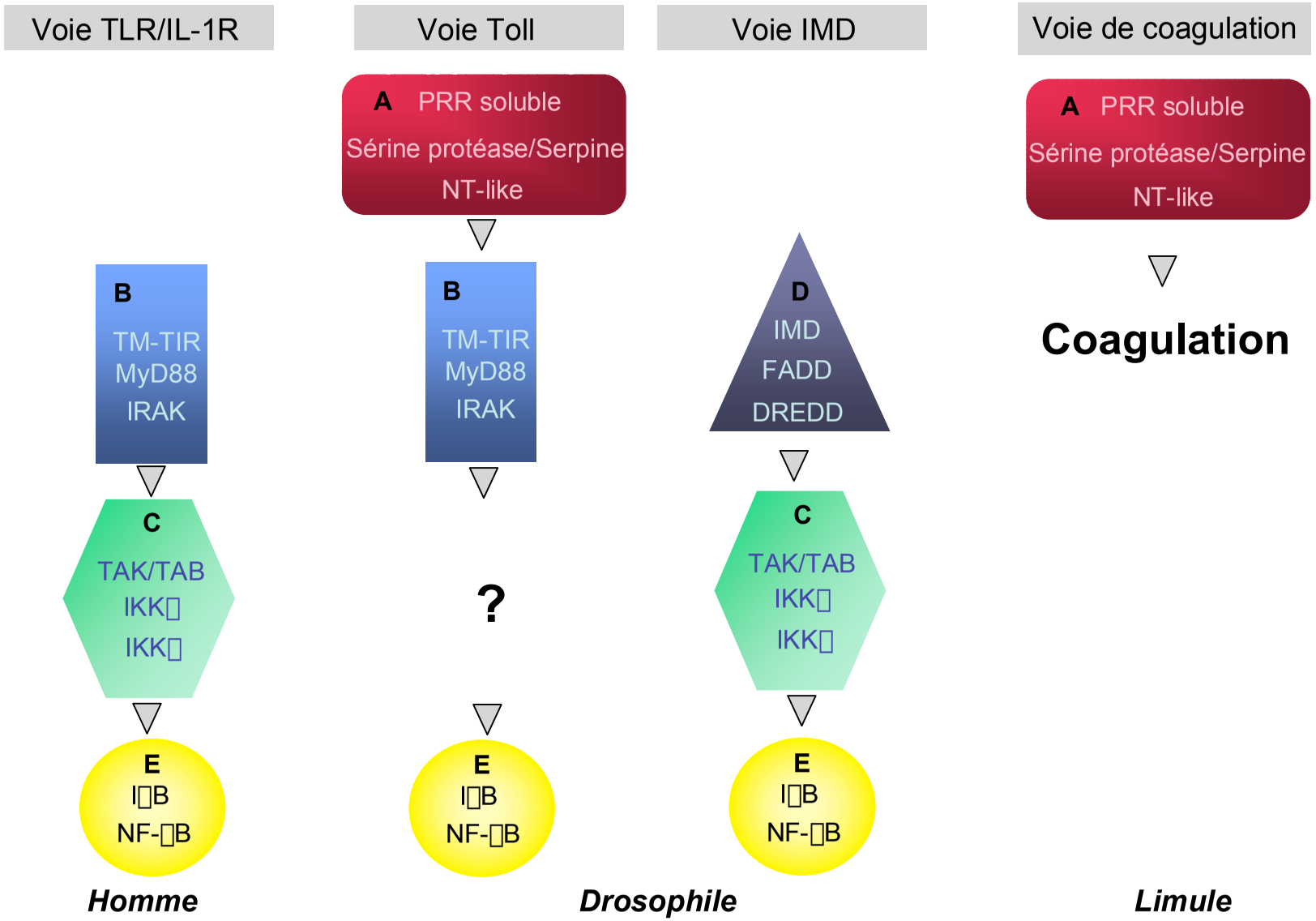


Figure 21. «Modules moléculaires» qui ont été conservés, et intégrés dans différentes voies de signalisation pour répondre le plus efficacement possible aux signaux d'infection chez l'homme, chez la drosophile et chez la limule. Le module A est constitué d'un PRR circulant qui active une cascade protéolytique aboutissant à l'activation d'une protéine de type neurotrophine (Spätzle chez la drosophile et le Coagulogène chez la limule). Le module B est constitué d'un récepteur transmembranaire à domaine TIR, de l'adaptateur MyD88 et de la kinase de type IRAK/Pelle. Le module C est composé de TAK1/TAB1/TAB2 et du complexe de IKK. Enfin, le domaine E consiste en un facteur de transcription de type NF-B et de son inhibiteur cytoplasmique (IB).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Je décris dans cette partie les techniques que j'ai mises au point lors de mon travail de thèse et qui n'étaient pas utilisées au laboratoire avant mon arrivée. Les autres techniques sont décrites dans les sections Materials and methods des trois articles présentés dans la partie Résultat ou dans le manuel (Sambrook et al., 1989).

I. INTERFERENCE PAR ARN DOUBLE-BRIN DANS LES CELLULES DE SCHNEIDER S2.

I. 1. Transcription in vitro.

L'interférence par ARN double-brin (RNAi) a été mise au point dans les cellules S2 d'après l'étude de Clemens *et al*(Clemens et al., 2000). Des fragments de 700pb sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN complémentaire des gènes à inactiver. Les oligonucléotides utilisés pour cette amplification contiennent un site de liaison à la T7 polymérase (5'-TTT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA-3'). Le produit PCR est purifié soit sur gel d'agarose, soit directement par Quiaquick (Quiagen). Il est ensuite quantifié. La concentration doit être de 125ng/µl au minimum. Le kit MEGAscript T7 transcription (Ambion, Austin, TX) est utilisé pour la transcription *in vitro*. On mélange les réactifs dans l'ordre suivant à température ambiante :

- H_2O RNAse free qsp 20µl,
- 2µl 10x reaction buffer
- 2µl ATP
- 2µl CTP
- 2µl GTP
- 2µl UTP
- 12µg d'ADN matrice
- 2µl T7 RNA polymérase.

Le tube est mélangé par inversion et incubé pendant 4 heures à 37°C.

Le produit de la réaction subit alors une précipitation éthanolique, le culot est lavé, séché et resuspendu dans 32µl d'eau RNAse free. On chauffe ensuite le tube pendant 30 minutes à 65°C, puis on laisse refroidir jusqu'à ce que le produit de la

réaction soit redescendu à la température de la pièce. On quantifie la quantité d'ARN double-brin obtenue en faisant un spectre de D.O.(Densité optique) sur une dilution au 1/100ème de la préparation (Une unité de D.O. correspond à 45µg/ml d'ARN double-brin). On dépose également 0,5µl du produit de la réaction sur un gel d'agarose RNAse free, pour vérifier que l'ARN double-brin n'est pas dégradé. On aliquote le produit de la réation à 3µg/µl, les aliquots sont stockés à –20°C.

I.2 Transfection des cellules par précipitation au phosphate de calcium.

Les cellules S2 (10^6/ml) sont transfectées dans des boîtes de culture de 6 cm de diamètre par la technique de précipitation au phosphate de calcium avec 0,1µg de plasmide rapporteur, 0,1µg de vecteur témoin exprimant la β-galactosidase, et 5µg d'ARN double-brin.

Pour l'induction par Toll, 1µg de vecteur exprimant Toll sous contrôle du promoteur inductible de la métallothionine est cotransfecté avec l'ARN double brin. Après 48 heures, les cellules sont stimulées avec 500µM de $CuSO_4$ pour 48 heures supplémentaires.

L'activation de la voie IMD est induite par l'ajout de 10µg/ml de LPS (E.coli serotype 055 :B5 ; Sigma) 72 heures après la transfection, 16h avant de récolter les cellules.

I.3 Transfection des cellules avec le kit lipofectin.

Cette technique permet de toucher une proportion plus importante de cellules que la précipitation au phosphate de calcium.

Les cellules sont réparties dans des plaques à 24 puits (1ml par puit, 10^6/ml). Deux tubes sont préparés pour chaque transfection :

A) Le premier tube contient du milieu Schneider sans sérum et sans antibiotique et un volume de lipofectine correspondant à 1/10ème du volume total : 135µl de milieu + 15µl de lipofectine/puit.

B) Le second tube contient 150µl de milieu Schneider sans sérum et sans antibiotique et 4µg d'ARN double brin par puit.

Après avoir agité en pipettant doucement, on laisse incuber les deux tubes 30 minutes à température ambiante. On mélange ensuite les tubes A et B. On laisse incuber 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec 1ml de milieu Schneider sans sérum et sans antibiotique et on ajoute le mélange. On laisse incuber 6 à 8 heures à 23°C. On ajoute alors 1ml de milieu frais de Schneider avec 10% de sérum et les cellules sont incubées 4 jours à 23°C, avant d'être récoltées.

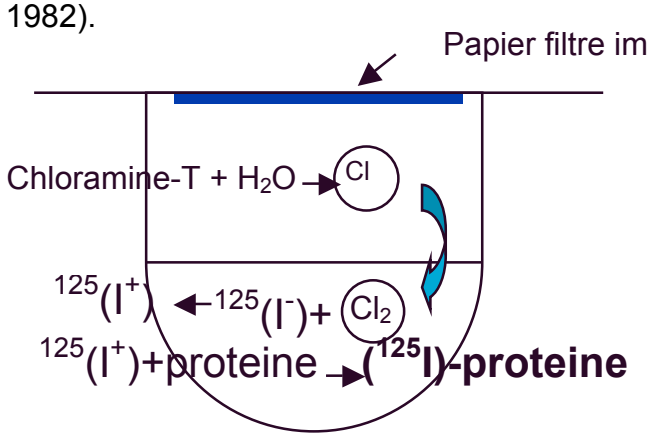
II. IMMUNOPRÉCIPITATIONS.

48 heures après transfection, 5.10^6 cellules sont récoltées, lavées une fois avec du PBS et lysées 10 minutes sur la glace dans 150µl de tampon de lyse (20mM Tris pH7,5, 150mM NaCl, 1%Triton X-100, 1µg/ml de pepstatine A, 1µg/ml d' antipaine, 1µg/ml de chymostatine, 1µg/ml de leupeptine et 1µg/ml d' aprotinine). Les débris cellulaires sont isolés par centrifugation 10 minutes à 10000g. 50µl du surnageant sont gardés à –80°C afin de vérifier par immunoblotting la présence dans le lysat des cellules des protéines codées par les gènes transfectés. Les 100µl de lysat restant sont incubés avec 20µl de billes de sépharose couplées à un anticorps monoclonal anti-Flag (M2) (Sigma, St.Louis, MO). Le tube est laissé en rotation une nuit à 4°C. Les billes sont ensuite lavées extensivement au PBS froid. Les protéines immunoprécipitées sont éluées par ébullition dans le tampon Laemmli et séparées par un gel SDS-Page dénaturant à10%. Après la migration, les cellules sont electroblottées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps monoclonal anti-V5 couplé à la péroxydase (HRP, InVitrogen). Les protéines sont détectées à l'aide d'un kit ECL + (Amersham Pharmacia, Orsay, France).

III. EXPERIENCES DE LIAISON D'UN LIGAND A SON RECEPTEUR.

III. 1. Marquage de la protéine à l'iode radioactif.

La protéine est iodinée par la technique des deux phases décrite par (Tejedor and Ballesta, 1982).



La réaction se fait dans une capsule en polypropylène de 1cm de diamètre. Des cercles de papier Whatmann 3MM (0,2cm^2) sont imprégnés de 1M NaCl et séchés. Le bord de la capsule est recouvert de graisse de silicone. La solution contenant la protéine (2µg dans 40µl tampon phosphate) et l'iode ($Na^{125}I$, 1mCi) sont déposées au fond de la capsule. Un cercle de papier est ensuite imprégné avec 10µl de chloramine-T (16mg/ml dans du tampon 100mM Borate pH8,5). Il est immédiatement déposé sur une lame de verre (4cm^2) qui ferme la capsule (cf shéma). Le papier est humide et adhère à la lame. Le silicone permet de sceller hermétiquement la capsule. La pièce de papier est changée après 10 min et l'opération est répétée trois ou quatre fois selon la protéine.

L'excès d'iode est éliminé en passant dans une colonne de 10cm de gel Sephadex G-25 (Pharmacia) équilibrée avec un tampon 100mM phosphate de sodium, pH7,4, contenant 0,02% de Tween 20. L'activité spécifique est mesurée au compteur gamma.

III. 2.Scatchard.

2.10^6 cellules par puit sont incubées dans une microplaque et mises en présence d'une concentration croissante de ligand radiomarqué (5nM à 10pM), et la liaison non spécifique est quantifiée en ajoutant un excès de 100 fois de ligand non marqué. Après 2 heures d'incubation à 4°C, la radioactivité liée aux cellules est séparée de la fraction qui n'est pas liée par centrifugation à travers une couche de 90% dibutylphtalate, 10% huile de paraffine. Après centrifugation, les tubes sont plongés dans l'azote, la partie inférieure (cellules) est coupée et déposée dans le compteur gamma. La partie supérieure du tube contient la fraction non liée et est également quantifiée au compteur gamma. La détermination des constantes d'affinité est faite selon les formules de Scatchard.

III. 3. Cross-linking.

2.10^6 cellules sont incubées en présence de 5,4nM de ligand radiomarqué avec ou sans un excès de 100 fois de ligand non marqué. Après 2 heures d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées et incubées pour 45 min à 20°C

dans du PBS, 1mM $MgCl_2$, 1mM BS3 (Pierce), 1mM EGS (Pierce), pH8,3. Après deux lavages, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1% de Brij 96 pendant une heure à 4°C. Les débris sont culottés pendant 45 min à 12000 rpm à 4°C. 50µl de surnageant sont ensuite déposés dans un tampon Laemmli sur un gel SDS 7% en conditions dénaturantes.

Après migration, le gel est laissé 20 min dans un bain de méthanol 50%, acide acétique 12%. Après 4 lavages à l'eau, il est transféré dans un bain de méthanol 30%, 3% glycérol pendant 30 min. Le gel est ensuite déposé sur papier Whatmann 3MM et recouvert d'une feuille de cellophane humide. Il est exposé pendant une nuit sur un film radiosensible.

ANNEXES

ANNEXE I

Imler J.L., Tauszig S., Jouanguy E., Forestier C., Hoffmann J.A. LPS-induced immune response in Drosophila. *J. of Endotoxin Res.* **6**, 459-462 (2000).

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Jean-Luc Imler, **Servane Tauszig**, Emmanuelle Jouanguy, Claire Forestier, Jules A. Hoffmann

LPS-induced immune response in *Drosophila*.

Journal of Endotoxin Research 6 (2000), 459-462

Pages 459-462 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

ANNEXE II

Bilak H., Tauszig-Delamasure S., Imler J.L. Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*. *Biochemical Society Transactions. Portland Press*. Sous presse.

Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*

Hana Bilak, Servane Tauszig-Delamasure and Jean-Luc Imler

UPR9022 CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg CEDEX, France

Abstract: The *Drosophila* Toll receptor controls the immune response to Gram-positive bacteria and fungi by activating a signaling pathway partially conserved through evolution. The *Drosophila* genome encodes eight additional Toll related receptors, most of which appear to carry developmental rather than immune functions. One exception may be Toll-9, which shares structural and functional similarities with mammalian TLRs.

Innate immunity represents a rapid and efficient response that multicellular organisms mount to defend themselves against infection. This first-line host defense system is conserved throughout evolution from Invertebrates to Vertebrates. In mammals, it plays an active role in the onset of the specific adaptive response. Activation of innate immunity relies on germ-line encoded receptors that recognize conserved microbial molecular patterns and are known as pattern recognition receptors (PRRs)[1]. The genetic tools developed in *Drosophila*, together with the fact that its immune system is devoid of the adaptive component, make this organism a powerful model to study the innate immune response. The fly's immune response is characterized by the synthesis of antimicrobial peptides by the fat body, an equivalent of the mammalian liver. These peptides can be used as efficient markers of the immune response, as their expression is significantly upregulated following infection. In 1996, it was shown that the Toll receptor controls the induction of one of these peptides, Drosomycin, following fungal infection. By contrast, induction of the antibacterial peptide Diptericin in response to Gram-negative bacterial infections involves a Toll-independent pathway[2]. In mammals,

work in the past five years has established Toll-Like Receptors (TLRs) as primordial receptors involved in the innate immune response mediating host response to distinct microbial patterns, from bacterial cell-wall LPS (TLR4) to viral dsRNA (TLR3) (reviewed in [3]).

1. The *Drosophila* Toll pathway

The *Drosophila* Toll receptor was initially discovered in the early 80s through a mutagenesis screen for genes involved in dorso-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. The gene was cloned in 1988, and shown to encode a transmembrane receptor, characterized by the presence of an intracytoplasmic domain that shows striking similarities to that of the IL-1 receptor (IL-1R). It is therefore referred to as the TIR (Toll-IL-1R) domain. Unlike that of the IL-1R, the ectodomain of Toll is not composed of Immunoglobulin-like motifs, but rather of leucine-rich repeats (LRRs), flanked by characteristic cystein-rich motifs (Fig1) [4].

A complex of signaling adaptors assembles around the TIR domain of Toll. DmMyD88, which contains both a TIR domain and a Death Domain (DD), plays a central role in this complex and interacts with the DD-containing kinase Pelle, the homologue of IRAK (IL-1R Associated Kinase) [5], [6], [7], [8]. Toll signaling requires another adaptor-like molecule, Tube, which interacts with both DmMyD88 and Pelle. Interestingly, TLR2 and TLR4 also require an additional adaptor, namely Mal/TIRAP, to activate NF-□B [9], [10]. Despite these homologies, there are some differences between the Toll receptor complex and that of TLRs; indeed, whereas in *Drosophila*, the DD domain of DmMyD88 acts as dominant-negative, in the mammalian system, it is the TIR domain that has this property. This may be correlated to the fact that Tube contains a DD, whereas Mal/TIRAP contains a TIR domain. In addition, DmMyD88 contains a 150 amino-acids C-Terminal extension (CTE), which is

absent from the mammalian factor MyD88, and is mandatory for proper signaling through Toll in *Drosophila* cells [11].

Activation of the receptor complex leads to degradation of the IκB homologue Cactus, enabling nuclear translocation of the NF-κB-like transcription factor Dif, which promotes expression of the *drosomycin* gene [12]. How Pelle signals to Cactus is still a matter of controversy. A TRAF6-like molecule has been identified in *Drosophila*, but so far there is no genetic evidence that it is involved in the Toll pathway. Furthermore, the *Drosophila* IKKβ and IKKγ homologues are not involved in the regulation of Cactus degradation, pointing to major differences in the components linking the Toll/TLR receptor complex to the nucleus in flies and mammals [2].

2. The *Drosophila* family of Toll receptors

As mentioned above, the response to Gram-negative bacterial infections in *Drosophila* is under the control of a Toll-independent pathway. The discovery that TLR4 played a crucial role in the response to LPS derived from Gram-negative bacteria suggested that a Toll-related receptor would be involved in the response to Gram-negative bacterial infections in *Drosophila*. Indeed, the *Drosophila* Toll family counts nine members (Toll, 18-Wheeler, Toll-3 to –9), which makes it comparable in size to that of mammalian TLRs [13], [14]. Overexpressing constitutively active versions of all the Tolls, be it alone or in combinations, does not mimic the effects of LPS treatment in the *Drosophila* macrophage-like S2 cells. Furthermore, inhibition of these receptors by RNA interference does not affect the cells' response to LPS or bacteria. Finally, *18w* mutant flies were recently shown to resist infection by bacteria or fungi much as wild-type flies, indicating that this receptor does not participate in host defense [15]. So far, mutants for the other *Toll* genes are not available. However, the

fact that *DmMyD88* mutant flies resist infection by Gram-negative bacteria much like wild-type flies does not support the hypothesis that Toll receptors participate in the sensing of Gram-negative bacterial infections [6]. This raises the question of the role of the eight other members of the family. In fact, most *Tolls* are highly expressed during embryogenesis and metamorphosis [13]. In-situ hybridization shows dynamic tissue- and stage-specific expression of these receptors, suggesting that they play a role in embryonic development [16]. In keeping with this possibility, phylogenetic analysis of TIR domains indicates that, with the exception of Toll-9 (see below), *Drosophila* Tolls are more closely related to each other than to mammalian TLRs [17]. This suggests that these two groups of receptors evolved independently, possibly to carry distinct functions, developmental in Insects, and related to host defense in mammals.

3. Detection of infectious non-self in *Drosophila*

The data discussed above leaves the question open as to the identity of PRRs in *Drosophila*. Although Toll mediates important receptor functions during infection in *Drosophila*, it is not a PRR. Rather, Toll is activated by the cytokine Spätzle (Spz). Upon infection, proteolytic cleavage of Spz yields a 12kDa C-terminal fragment that is thought to bind to and activate Toll [18]. Recognition of Gram-positive bacteria involves the secreted Peptidoglycan recognition protein PGRP-SA, which is thought to activate yet unknown proteases [19]. In the case of fungal infections, a yet unknown PRR activates the serine protease Persephone [20]. Thus, in *Drosophila*, non-self recognition occurs upstream of Toll, and activates a proteolytic cascade which generates an active ligand for Toll. PGRPs are highly conserved from Insects to mammals, and the *Drosophila* genome contains 13 members of this family, secreted or membrane associated [21]. One of these, PGRP-LC, was recently

shown to be an essential component of the receptor complex sensing Gram-negative bacterial infections [22], [23], [24]. Therefore, individual members of this family may be activated by specific microbial patterns, in the same way as TLRs are in mammals.

Toll-9 is structurally related to TLRs, both in the TIR domain [17] and in the ectodomain, as it is the only *Drosophila* Toll receptor that does not have N-flanking cystein-rich motifs (Fig1). Interestingly, transfection of S2 cells with a constitutively active version of Toll-9 leads to activation of the *drosomycin* promoter, suggesting that it can signal to the IκB homologue Cactus (Fig2, see also [14]). This activation is blocked by dominant-negative versions of DmMyD88 or Pelle, implying that Toll-9 uses the same signaling pathway as Toll does to promote *drosomycin* expression (Fig2).

Concluding remarks

In conclusion, the Toll receptor plays a critical role in the onset of the immune response in *Drosophila*. However, it does not function like mammalian TLRs, and requires the cytokine Spz for its activation. Genetic screens in *Drosophila* have recently identified another evolutionary conserved family of receptors, the PGRPs, one of which functions upstream of Toll in the response to Gram-positive bacterial infections. *Drosophila* also expresses one TLR-like molecule, Toll-9. Identification of the stimuli to which it responds, and characterization of its function in *Drosophila* could shed light on the ancestral function of TLRs.

Acknowledgments: We would like to thank Jules Hoffmann for continuous interest and support, and for critically reading the manuscript, as well as our colleagues for stimulating discussions and suggestions. We acknowledge financial support by CNRS, the

Institut Universitaire de France, the NIH (grant 1PO1 AI44220). S.T. is supported by a short-term fellowship from the Ligue Contre le Cancer.

References:

1 Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. (1999) Science **284**, 1313-8

2 Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (2002) Nat Immunol **3**, 121-6.

3 Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001) Nat Immunol **2**, 675-80.

4 Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2002) Curr Top Microbiol Immunol **270**, 63-79

5 Horng, T. and Medzhitov, R. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12654-12658

6 Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. (2002) Nat Immunol **3**, 91-7.

7 Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G. and Wasserman, S. A. (2002) Proc Natl Acad Sci U S A **99**, 12871-6

8 Charatsi, I., Luschnig, S., Bartoszewski, S., Nüsslein-Volhard, C. and Moussian, B. (2003) Mechanisms of Development **in press**

9 Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. and Medzhitov, R. (2002) Nature **420**, 329-33.

10 Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Nature **420**, 324-9.

11 Kambris, Z., Bilak, H., D'Alessandro, R., Belvin, M., Imler, J. L. and Capovilla, M. (2003) EMBO Rep **4**, 64-9

12 Rutschmann, S., Jung, A., Hetru, C., Reichhart, J., Hoffmann, J. and Ferrandon, D. (2000) Immunity **12**, 569-580

13 Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 10520-5

14 Ooi, J. Y., Yagi, Y., Hu, X. and Ip, Y. T. (2002) EMBO Rep **3**, 82-7.

15 Ligoxygakis, P., Bulet, P. and Reichhart, J. M. (2002) EMBO Rep **3**, 666-73.

16 Kambris, Z., Hoffmann, J. A., Imler, J. L. and Capovilla, M. (2002) Gene Expression Patterns **2**, 311-317

17 Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. and Beutler, B. (2000) Eur. Cytokine Netw. **11**, 362-371

18 Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (1999) Science **285**, 1917-9

19 Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. and Royet, J. (2001) Nature **414**, 756-9.

20 Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (2002) Science **297**, 114-6.

21 Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H. and Hultmark, D. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 13772-7.

22 Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. and Royet, J. (2002) Nature **416**, 640-4.

23 Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D. and Anderson, K. V. (2002) Science **296**, 359-62.
24 Ramet, M., Manfruelli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. and Ezekowitz, R. A. (2002) Nature **416**, 644-8.

Figure Legends:

Figure1:
TIR domain receptors in *Drosophila* and mammals

The ectodomain of Tolls and TLRs are largely composed of leucine-rich repeats (LRR), flanked by characteristic cystein-rich motifs (C- or N-flank). N-flank motifs are present in *Drosophila* Toll-1 to Toll-8, but not in Toll-9 or mammalian TLRs. The ectodomain of the IL-1 receptor is composed of three immunoglobulin (Ig) domains.

Figure2
Activation of the *drosomycin* promoter in S2 cells by a constituvely active version of Toll-9 requires Pelle and DmMyD88.

a: S2 cells were cotransfected with expression vectors and reporter constructs expressing luciferase under control of the *drosomycin* promoter. Transfection with an expression vector for Toll-9 deleted of its leucine-rich repeats (Toll-9□LRR) activates the *drosomycin* promoter. This activation is inhibited by co-transfection of a dominant-negative version of Pelle (Pelle DN). The experiments were done in triplicate; results represent mean ± s.e.m.
b: In the same manner, activation of the *drosomycin* promoter by Toll-9 is also blocked by a dominant-negative version of DmMyD88 (DmMyD88 DN). The graph shows results obtained for two independent experiments.

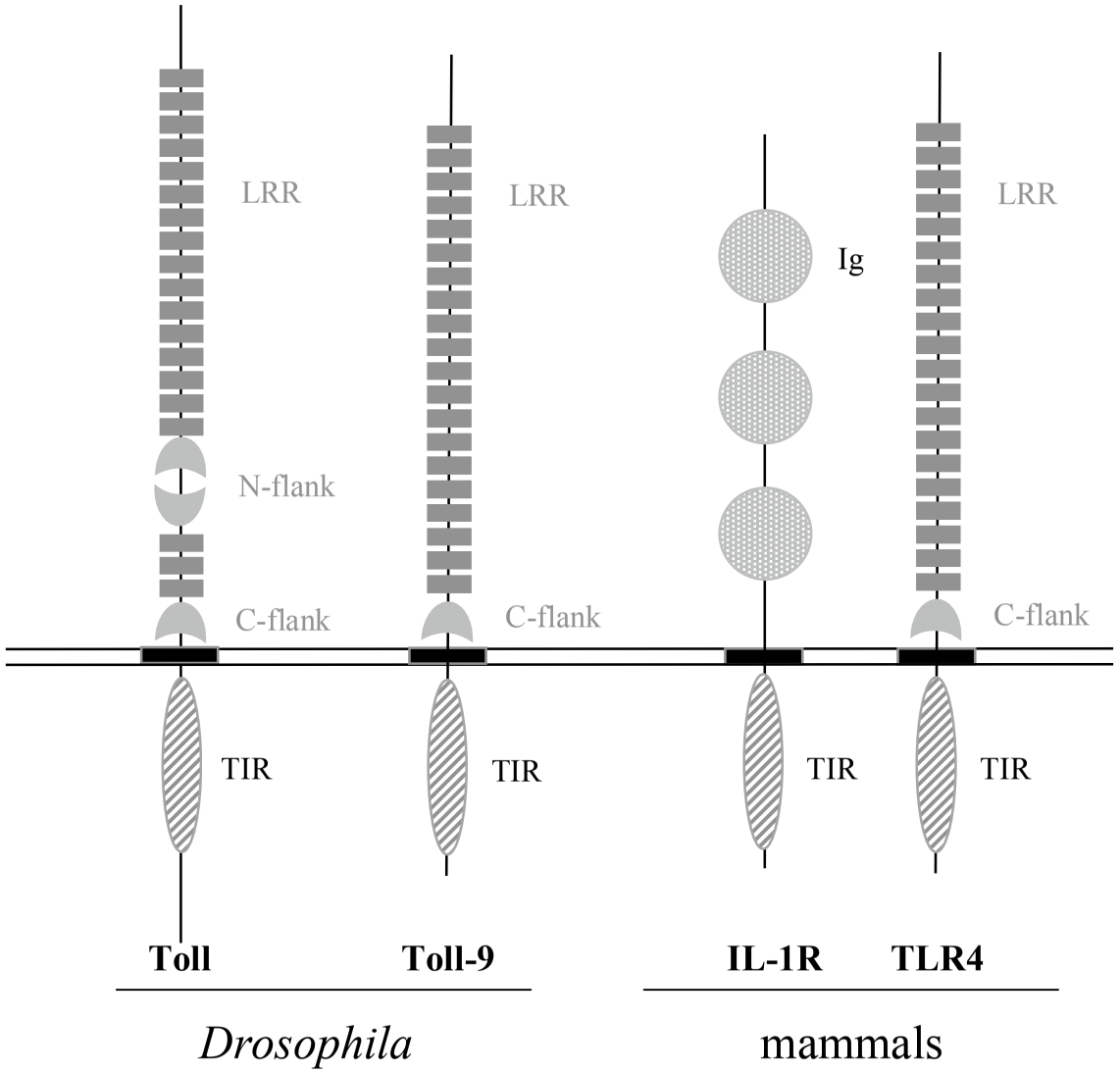


Figure1, Bilak *et al*.

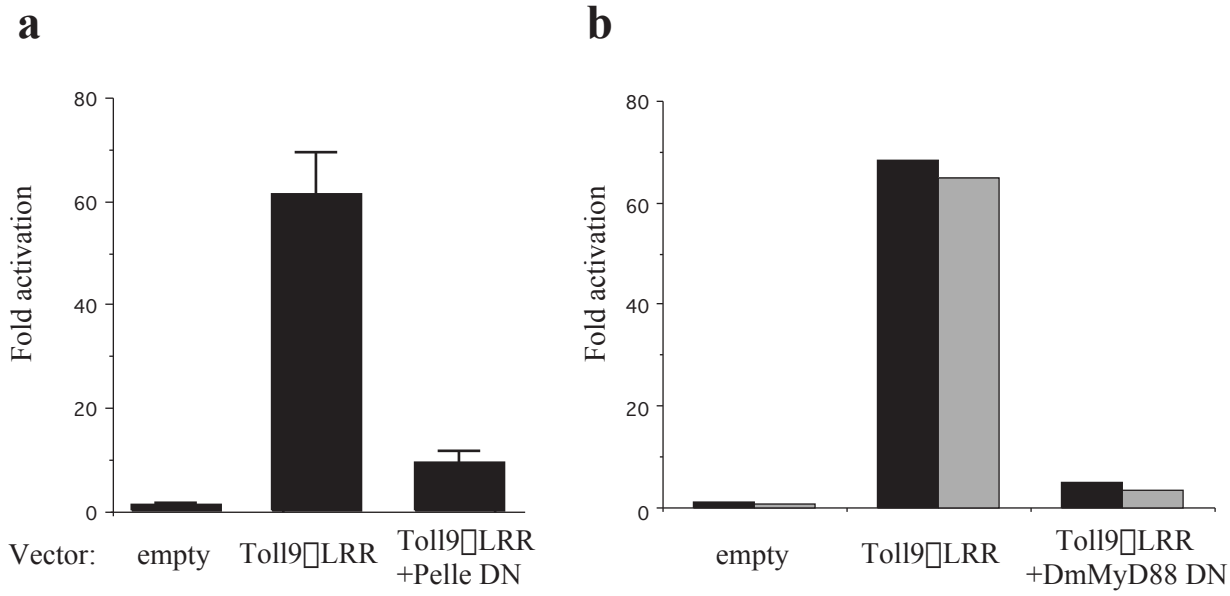


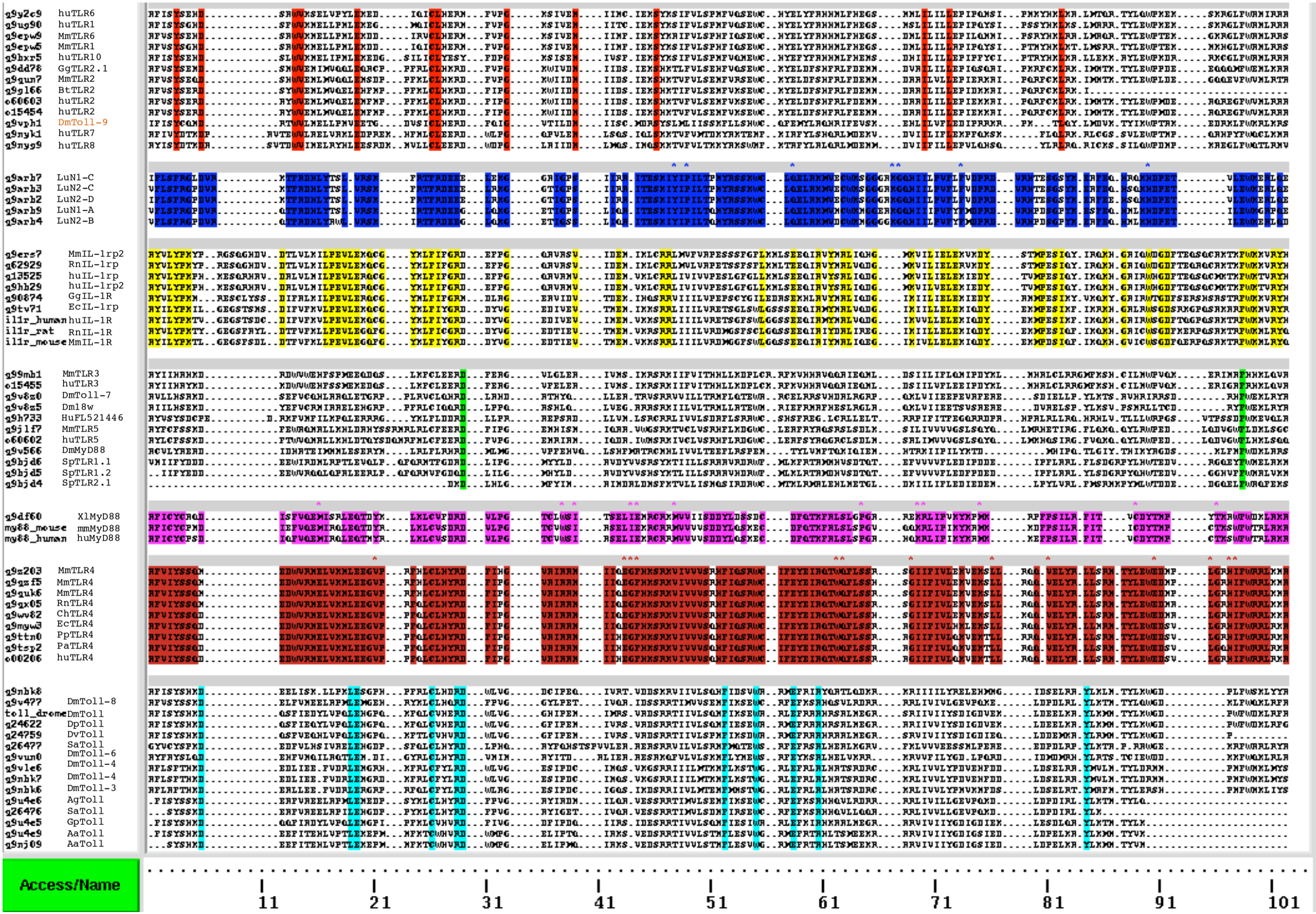
Figure 2, Bilak *et al*.

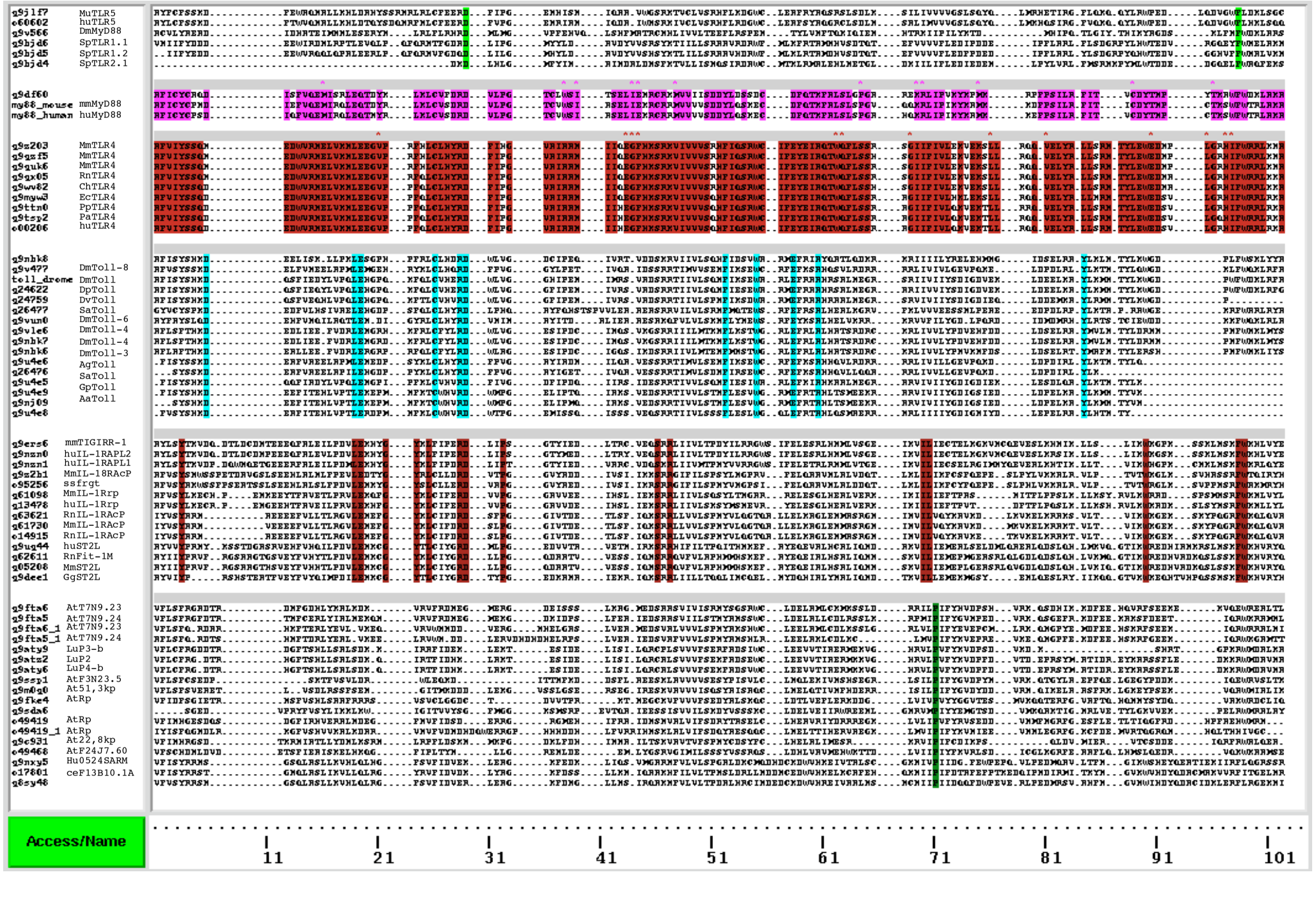
ANNEXE III

Alignement de protéines à domaine TIR.

Cet alignement a été réalisé par Olivier Poch (LSIIT-ICPS (AXE E), UPRES-A CNRS 70005 Universite Louis Pasteur, 67400 Illkirch, France) et a permis de réaliser l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 7. Il a été obtenu à l'aide de l'algorithme DPC (Wicker et al., 2002). Treize groupes de protéines sont constitués en fonction des identités de séquence. Le code de chacune des protéines provient de la banque de données Pfam.

(http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml).


Access/Name
11
21
31
41
51
61
71
81
91
101


q9jlf7 MuTLR5
o60602 huTLR5
q9v566 DmMyD88
q9hjd6 SpTLR1.1
q9hjd5 SpTLR1.2
q9hjd4 SpTLR2.1
q9df60
my88_mouse mmMyD88
my88_human huMyD88
q9x203 MmTLR4
q9qxf5 MmTLR4
q9quk6 MmTLR4
q9qx05 RnTLR4
q9wv82 ChTLR4
q9myw3 EcTLR4
q9ttn0 PpTLR4
q9tsp2 PaTLR4
o00206 huTLR4
q9nhk8
q9v477 DmToll-8
toll_drome DmToll
q24622 DpToll
q24759 DvToll
q26477 SaToll
q9vun0 DmToll-6
q9vle6 DmToll-4
q9nhk7 DmToll-4
q9nhk6 DmToll-3
q9u4e6 AgToll
q26476 SaToll
q9u4e5 GpToll
q9u4e9 AaToll
q9nj09
q9u4e8
q9ers6 mmTIGIRR-1
q9nzn0 huIL-1RAPL2
q9nzn1 huIL-1RAPL1
q9z2b1 MmIL-18RAcP
o95256 ssfrgt
q61098 MmIL-1Rrp
q13478 huIL-1Rrp
q63621 RnIL-1RAcP
q61730 MmIL-1RAcP
o14915 RnIL-1RAcP
q9uq44 huST2L
q62611 RnFit-1M
q05208 MmST2L
q9dee1 GgST2L
q9fta6 AtT7N9.23
q9fta5 AtT7N9.24
q9fta6_1 AtT7N9.23
q9fta5_1 AtT7N9.24
q9sty9 LuP3-b
q9stz2 LuP2
q9sty6 LuP4-b
q9ssp1 AtF3N23.5
q9m0q0 At51,3kp
q9fke4 AtRp
q9zda6
o49419 AtRp
o49419_1 AtRp
q9c931 At22,8kp
o49468 AtF24J7.60
q9nxy5 Hu0524SARM
o17801 ceF13B10.1A
q8sy48
Access/Name
11
21
31
41
51
61
71
81
91
101

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature *408*, 796-815.

Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett *85*, 85-95.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol *2*, 675-680.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3. Nature *413*, 732-738.

Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R. T., Medzhitov, R., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. Nat Med *8*, 878-884.

Anderson, K. V., and Nusslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. Nature *311*, 223-227.

Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., and Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet *25*, 187-191.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., and Calderwood, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem *277*, 15028-15034.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245-252.

Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A., and Lemaitre, B. (2000). The phytopathogenic bacteria Erwinia carotovora infects Drosophila and activates an immune response. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 3376-3381.

Belvin, M. P., and Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. Ann Rev Cell Dev Biol *12*, 393-416.

Bergner, A., Oganessyan, V., Muta, T., Iwanaga, S., Typke, D., Huber, R., and Bode, W. (1996a). Crystal structure of a coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: a structural homologue of nerve growth factor. Embo J *15*, 6789-6797.

Bergner, A., Oganessyan, V., Muta, T., Iwanaga, S., Typke, D., Huber, R., and Bode, W. (1996b). Crystal structure of a coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: a structural homologue of nerve growth factor. Embo J *15*, 6789-6797.

Beutler, B., and Rehli, M. (2002). Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. Curr Top Microbiol Immunol *270*, 1-21.

Biragyn, A., Ruffini, P. A., Leifer, C. A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A. K., Farber, J. M., Segal, D. M., Oppenheim, J. J., and Kwak, L. W. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. Science *298*, 1025-1029.

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.

Braun, A., Hoffmann, J. A., and Meister, M. (1998). Analysis of the Drosophila host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 14337-14342.

Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A*., et al.* (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. N Engl J Med *347*, 869-877.

Buchanan, S. G., and Gay, N. J. (1996). Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. Prog Biophys Mol Biol *65*, 1-44.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Comp Immunol *23*, 329-344.

Carton, Y., and Nappi, A. J. (2001). Immunogenetic aspects of the cellular immune response of Drosophilia against parasitoids. Immunogenetics *52*, 157-164.

Charatsi, I., Luschnig, S., Bartoszewski, S., Nusslein-Volhard, C., and Moussian, B. (2003). Krapfen/dMyd88 is required for the establishment of dorsoventral pattern in the Drosophila embryo. Mech Dev *120*, 219-226.

Chiang, C., and Beachy, P. A. (1994). Expression of a novel Toll-like gene spans the parasegment boundary and contributes to hedgehog function in the adult eye of Drosophila. Mech Dev *47*, 225-239.

Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D., and Anderson, K. V. (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in Drosophila. Science *296*, 359-362.

Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., Collins, F. H., Danielli, A., Dimopoulos, G*., et al.* (2002). Immunity-related genes and gene families in Anopheles gambiae. Science *298*, 159-165.

Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A., and Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 6499-6503.

da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J Biol Chem *276*, 21129-21135.

De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. L., Iwanaga, S., Lemaitre, B., and Brey, P. T. (2002a). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in Drosophila. Dev Cell *3*, 581-592.

De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M., and Lemaitre, B. (2001). Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 12590-12595.

De Gregorio, E., Spellman, P. T., Tzou, P., Rubin, G. M., and Lemaitre, B. (2002b). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila. Embo J *21*, 2568-2579.

DeLotto, Y., and DeLotto, R. (1998). Proteolytic processing of the Drosophila Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. Mech Dev *72*, 141-148.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell *103*, 351-361.

Dissing, M., Giordano, H., and DeLotto, R. (2001). Autoproteolysis and feedback in a protease cascade directing Drosophila dorsal-ventral cell fate. Embo J *20*, 2387-2393.

Dushay, M., Asling, B., and Hultmark, D. (1996). Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA *93*, 10343-10347.

Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M., and Royet, J. (2002). Notch Signaling Controls Lineage Specification during Drosophila Larval Hematopoiesis. Curr Biol *12*, 1923-1927.

Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. J Exp Med *196*, 1645-1651.

Ekengren, S., and Hultmark, D. (1999). *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. Insect Biochem Mol Biol *29*, 965-972.

Eldon, E., Kooyer, S., D'Evelyn, D., Duman, M., Lawinger, P., Botas, J., and Bellen, H. (1994). The Drosophila 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. Development *120*, 885-899.

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., and Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in Drosophila. Curr Biol *10*, 781-784.

Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broeckaert, W., Hetru, C., and Hoffmann, J. (1994). Insect immunity: septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. J Biol Chem *269*, 33159-33163.

Ferrandon, D., Jung, A., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J., and Hoffmann, J. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the *Toll* pathway. EMBO J *17*, 1217-1227.

Franc, N., Dimarcq, J., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R. (1996). Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. Immunity *4*, 431-443.

Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (2001). Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates the antibacterial response and can promote apoptosis. Development Cell *1(4)*, 503-514.

Gerttula, S., Jin, Y. S., and Anderson, K. V. (1988). Zygotic expression and activity of the Drosophila Toll gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. Genetics *119*, 123-133.

Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol *167*, 1882-1885.

Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D., and Royet, J. (2002). The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. Nature *416*, 640-644.

Grosshans, J., Bergmann, A., Haffter, P., and Nüsslein-Volhard, C. (1994). Activation of the kinase Pelle by Tube in the dorsoventral signal transduction pathway of drosophila embryo. Nature *372*, 563-566.

Guillot, L., Balloy, V., McCormack, F. X., Golenbock, D. T., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2002). Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. J Immunol *168*, 5989-5992.

Halfon, M. S., Hashimoto, C., and Keshishian, H. (1995). The Drosophila toll gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development. Dev Biol *169*, 151-167.

Hashimoto, C., Gertulla, S., and Anderson, K. (1991). Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. Development *111*, 1021-1028.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll- like receptor 5. Nature *410*, 1099-1103.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. Nat Immunol *3*, 196-200.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature *408*, 740-745.

Hess, D., Schaller, J., Rickli, E. E., and Clemetson, K. J. (1991). Identification of the disulphide bonds in human platelet glycocalicin. Eur J Biochem *199*, 389-393.

Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., and Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll- like receptors. Nature *420*, 329-333.

Horng, T., and Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. Proc Natl Acad Sci USA *98*, 12654-12658.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol *162*, 3749-3752.

Hu, S., and Yang, X. (2000). dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the Drosophila caspase DREDD. J Biol Chem *275*, 30761-30764.

Imamura, M., and Yamakawa, M. (2002). Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from the silkworm, Bombyx mori. Biochim Biophys Acta *1576*, 246-254.

Ip, Y., Reach, M., Enstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K., and Levine, M. (1993). Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in Drosophila. Cell *75*, 753-763.

Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., and Hetru, C. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 15119-15124.

Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Murakami, S., Sano, H., Konishi, M., Akino, T., and Kuroki, Y. (2002). The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from Staphylococcus aureus. J Biol Chem *277*, 24315-24320.

Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y., and Platt, J. L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. J Immunol *168*, 5233-5239.

Kaisho, T., Hoshino, K., Iwabe, T., Takeuchi, O., Yasui, T., and Akira, S. (2002). Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. Int Immunol *14*, 695-700.

Kajava, A. V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. J Mol Biol *277*, 519-527.
Kambris, Z., Bilak, H., D'Alessandro, R., Belvin, M., Imler, J. L., and Capovilla, M. (2003). DmMyD88 controls dorsoventral patterning of the Drosophila embryo. EMBO Rep *4*, 64-69.

Kambris, Z., Hoffmann, J. A., Imler, J. L., and Capovilla, M. (2002). Tissue and stage-specific expression of the *Tolls* in *Drosophila* embryos. Mechanisms of development *in press*.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity *11*, 115-122.

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. J Immunol *167*, 5887-5894.

Keith, J., and Gay, N. (1990). The Drosophila membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. EMBO J *9*, 4299-4306.

Kiechl, S., Lorenz, E., Reindl, M., Wiedermann, C. J., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Willeit, J., and Schwartz, D. A. (2002). Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. N Engl J Med *347*, 185-192.

Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2000). Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in Drosophila melanogaster cells. J Biol Chem *275*, 32721-32727.

Kobe, B., and Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr Opin Struct Biol *11*, 725-732.

Koedel, U., Angele, B., Rupprecht, T., Wagner, H., Roggenkamp, A., Pfister, H. W., and Kirschning, C. J. (2003). Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. J Immunol *170*, 438-444.

Kresse, H., Hausser, H., and Schonherr, E. (1993). Small proteoglycans. Experientia *49*, 403-416.
Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M., and Hoffmann, J. A. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 11427-11432.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in Drosophila. Dev Biol *230*, 243-257.

Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J., and Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature *416*, 603-607.

Lebestky, T., Jung, S. H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis. Genes Dev *17*, 348-353.

Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr Opin Immunol *11*, 23-27.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in Drosophila. Embo J *14*, 536-545.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J., and Hoffmann, J. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell *86*, 973-983.

LeMosy, E. K., Hong, C. C., and Hashimoto, C. (1999). Signal transduction by a protease cascade. Trends Cell Biol *9*, 102-107.

LeMosy, E. K., Tan, Y. Q., and Hashimoto, C. (2001). Activation of a protease cascade involved in patterning the Drosophila embryo. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 5055-5060.

Letsou, A., Alexander, S., Orth, K., and Wasserman, S. A. (1991). Genetic and molecular characterization of tube, a Drosophila gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 810-814.

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M., and Lemaitre, B. (2000). The Drosophila caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. EMBO reports *1*, 353-358.

Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2002). Inducible Expression of Double-Stranded RNA Reveals a Role for dFADD in the Regulation of the Antibacterial Response in Drosophila Adults. Curr Biol *12*, 996-1000.

Levashina, E., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J., Hetru, C., and Hoffmann, J. (1995). Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from Drosophila with antibacterial and antifungal properties. Eur J Biochem *233*, 694-700.

Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin- deficient Drosophila. Science *285*, 1917-1919.

Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., and Kafatos, F. C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, Anopheles gambiae. Cell *104*, 709-718.

Lien, E., Means, T. K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M. J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B.*, et al.* (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. J Clin Invest *105*, 497-504.

Ligoxygakis, P., Bulet, P., and Reichhart, J. M. (2002). Critical evaluation of the role of the Toll-like receptor 18-Wheeler in the host defense of Drosophila. EMBO Rep *3*, 666-673.

Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002a). Activation of Drosophila Toll during fungal infection by a blood serine protease. Science *297*, 114-116.

Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., Jiang, H., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002b). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of Drosophila. Embo J *21*, 6330-6337.

Liu, L., Roberts, A. A., and Ganz, T. (2003). By IL-1 Signaling, Monocyte-Derived Cells Dramatically Enhance the Epidermal Antimicrobial Response to Lipopolysaccharide. J Immunol *170*, 575-580.

Lopez, J. A., and Dong, J. F. (1997). Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex. Curr Opin Hematol *4*, 323-329.

Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C., and Schwartz, D. A. (2000). A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun *68*, 6398-6401.

Lu, Y., Wu, L. P., and Anderson, K. V. (2001). The antibacterial arm of the drosophila innate immune response requires an IkappaB kinase. Genes Dev *15*, 104-110.

Luna, C., Hoa, N. T., Zhang, J., Kanzok, S. M., Brown, S. E., Imler, J. L., Knudson, D. L., and Zheng, L. (2003). Characterization of three Toll-like genes from mosquito Aedes aegypti. Insect Mol Biol *12*, 67-74.

Luna, C., Wang, X., Huang, Y., Zhang, J., and Zheng, L. (2002). Characterization of four Toll related genes during development and immune responses in Anopheles gambiae. Insect Biochem Mol Biol *32*, 1171-1179.

Manfruelli, P., Reichhart, J. M., Steward, R., Hoffmann, J. A., and Lemaitre, B. (1999). A mosaic analysis in Drosophila fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. Embo J *18*, 3380-3391.

Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell *91*, 295-298.

Meng, X., Khanuja, B. S., and Ip, Y. T. (1999). Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF- kappaB factor. Genes Dev *13*, 792-797.

Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., and Royet, J. (2001). Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. Nature *414*, 756-759.

Milan, M., Weihe, U., Perez, L., and Cohen, S. M. (2001). The LRR proteins capricious and Tartan mediate cell interactions during DV boundary formation in the Drosophila wing. Cell *106*, 785-794.

Mizuguchi, K., Parker, J. S., Blundell, T. L., and Gay, N. J. (1998). Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle [published erratum appears in Trends Biochem Sci 1998 Sep;23(9):361]. Trends Biochem Sci *23*, 239-242.

Moriki, T., Murata, M., Kitaguchi, T., Anbo, H., Handa, M., Watanabe, K., Takahashi, H., and Ikeda, Y. (1997). Expression and functional characterization of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib alpha (Met239 --> Val) reported in patients with platelet-type von Willebrand disease. Blood *90*, 698-705.

Morisato, D., and Anderson, K. (1994). The spätzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. Cell *76*, 677-688.

Muta, T., and Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. Curr Opin Immunol *8*, 41-47.

Naitza, S., Rosse, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Camonis, J., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002). The Drosophila immune defence against Gram-negative infection requires the death domain protein dFADD. Immunity *in press*.

Ninkina, N., Grashchuck, M., Buchman, V. L., and Davies, A. M. (1997). TrkB variants with deletions in the leucine-rich motifs of the extracellular domain. J Biol Chem *272*, 13019-13025.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., and Strauss, J. F., 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem *276*, 10229-10233.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., and Seya, T. (2003). TICAM-1, an adapter molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-β induction. Nature Immunol *4*, 4, 161-167.

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 13766-13771.

Parker, J. S., Mizuguchi, K., and Gay, N. J. (2001). A family of proteins related to Spatzle, the toll receptor ligand, are encoded in the Drosophila genome. Proteins *45*, 71-80.

Petersen, U., Bjorklund, G., Ip, Y., and Engstrom, Y. (1995). The dorsal related immunity factor, Dif, is a sequence specific trans-activator of drosophila cecropin gene expression. EMBO J *14*, 3146-3158.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C.*, et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science *282*, 2085-2088.

Poltorak, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Citterio, S., and Beutler, B. (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 2163-2167.

Pujol, N., Link, E. M., Liu, L. X., Kurz, C. L., Alloing, G., Tan, M., Ray, K. P., Solari, R., Johnson, C. D., and Ewbank, J. J. (2001). A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in Caenorhabditis elegans. Curr Biol *11*, 809-821.

Qiu, P., Pan, P. C., and Govind, S. (1998). A role for the Drosophila Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. Development *125*, 1909-1920.

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4) [see comments] [published erratum appears in J Exp Med 1999 May 3;189(9):following 1518]. J Exp Med *189*, 615-625.

Ramet, M., Manfruelli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for E. coli. Nature *416*, 644-648.

Ramet, M., Pearson, A., Manfruelli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., and Ezekowitz, R. A. (2001). Drosophila scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. Immunity *15*, 1027-1038.

Reinke, R., Krantz, D. E., Yen, D., and Zipursky, S. L. (1988). Chaoptin, a cell surface glycoprotein required for Drosophila photoreceptor cell morphogenesis, contains a repeat motif found in yeast and human. Cell *52*, 291-301.

Rizki, T., and Rizki, R. (1984). The cellular defense system of Drosophila melanogaster. In Insect ultrastructure, R. King, and H. Akai, eds. (Plenum Publishing Corporation), pp. 579-604.

Roth, S., Hiromi, Y., Godt, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). cactus, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in Drosophila embryos. Development *112*, 371-388.

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*, 2169-2187.

Rutschmann, S., Jung, A., Hetru, C., Reichhart, J., Hoffmann, J., and Ferrandon, D. (2000a). The Rel protein DIF mediates the Toll-dependent antifungal response in *Drosophila*. Immunity *12*, 569-580.

Rutschmann, S., Jung, A., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000b). Role of *Drosophila* IKK□in a Toll-independent antibacterial immune response. Nature Immunol *1*, 342-347.

Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). The Toll pathway is required for resistance to gram- positive bacterial infections in Drosophila. J Immunol *168*, 1542-1546.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn (Plain View, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schneider, D., Hudson, K., Lin, T., and Anderson, K. (1991). Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. Genes & Dev *5*, 797-807.

Schneider, R., and Schweiger, M. (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. Oncogene *6*, 1807-1811.

Seppo, A., Matani, P., Sharrow, M., and Tiemeyer, M. (2003). Induction of neuron-specific glycosylation by Tollo/Toll-8, a Drosophila Toll-like receptor expressed in non-neural cells. Development *130*, 1439-1448.

Shelton, C. A., and Wasserman, S. A. (1993). pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the Drosophila embryo. Cell *72*, 515-525.

Shen, B., and Manley, J. L. (1998). Phosphorylation modulates direct interactions between the Toll receptor, Pelle kinase and Tube. Development *125*, 4719-4728.

Silverman, N., and Maniatis, T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. Genes Dev *15*, 2321-2342.

Smiley, S. T., King, J. A., and Hancock, W. W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol *167*, 2887-2894.

Soderhall, K., and Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr Opin Immunol *10*, 23-28.

Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., and Hultmark, D. (2000). Activation of the Drosophila NF-□B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. EMBO reports *1*, 347-352.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S.*, et al.* (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. Nature *416*, 750-756.

Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in Drosophila larvae. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 13705-13710.

Takeuchi, O., Hoshino, K., and Akira, S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. J Immunol *165*, 5392-5396.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity *11*, 443-451.

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immunol *13*, 933-940.

Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol *169*, 10-14.

Tejedor, F., and Ballesta, J. P. (1982). Iodination of biological samples without loss of functional activity. Anal Biochem *127*, 143-149.

Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila. Development *120*, 1829-1837.

Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., and Simon, J. C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. J Exp Med *195*, 99-111.

Towb, P., Bergmann, A., and Wasserman, S. A. (2001). The protein kinase Pelle mediates feedback regulation in the Drosophila Toll signaling pathway. Development *128*, 4729-4736.

Tzou, P., De Gregorio, E., and Lemaitre, B. (2002). How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol *5*, 102-110.
Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia. Immunity *13*, 737-748.

Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr Opin Immunol *11*, 19-22.

Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A., and Bulet, P. (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of Drosophila: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of- flight mass spectrometry study. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 11342-11347.

Vabulas, R. M., Wagner, H., and Schild, H. (2002). Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. Curr Top Microbiol Immunol *270*, 169-184.

van Kesteren, R. E., Fainzilber, M., Hauser, G., van Minnen, J., Vreugdenhil, E., Smit, A. B., Ibanez, C. F., Geraerts, W. P., and Bulloch, A. G. (1998). Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. Embo J *17*, 2534-2542.

Vicente, V., Houghten, R. A., and Ruggeri, Z. M. (1990). Identification of a site in the alpha chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding. J Biol Chem *265*, 274-280.

Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the Drosophila dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. Genes Dev *15*, 1900-1912.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature *412*, 346-351.

Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 13772-13777.

Wicker, N., Dembele, D., Raffelsberger, W., and Poch, O. (2002). Density of points clustering, application to transcriptomic data analysis. Nucleic Acids Res *30*, 3992-4000.

Windisch, J. M., Auer, B., Marksteiner, R., Lang, M. E., and Schneider, R. (1995). Specific neurotrophin binding to leucine-rich motif peptides of TrkA and TrkB. FEBS Lett *374*, 125-129.

Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., and Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. Nature *408*, 111-115.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T.*, et al.* (2002a). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature *420*, 324-329.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002b). Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN-beta Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. J Immunol *169*, 6668-6672.

Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol *163*, 1-5.