

THESE

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

Hana Bilak

DmMyD88, un nouvel élément pour l'étude des récepteurs Toll de la drosophile

Soutenue le 17 septembre 2004 devant la commission d'examen:

M. Jonathan Ewbank

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille

M. Nick Gay

Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge

M. Eric Westhof

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

M. Jules Hoffmann

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

M. Jean-Luc Imler

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Monsieur Jules Hoffmann, pour m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche scientifique dans des conditions particulièrement stimulantes. Grâce à vous nous travaillons tous dans un environnement matériel et intellectuel exceptionnel. Je vous remercie particulièrement de votre aide et de votre intérêt à mon égard, ainsi que de vos conseils avisés. Je garde un excellent souvenir des discussions que nous avons eues au sujet de l'avenir de la recherche ainsi que du mien.

Je remercie Monsieur Jonathan Ewbank, Monsieur Nick Gay et Monsieur Eric Westhof d'avoir accepté de lire et de juger ce travail. Je me réjouis d'en discuter bientôt avec vous.

Merci à Jean-Luc Imler de m'avoir si bien guidée à travers les méandres de l'immunité... J'ai appris tant de choses à tes côtés pendant ces quatre années. Merci d'avoir été si présent et si compréhensif, d'avoir cru en moi et d'avoir, même dans les moments de doute, toujours ouvert ta porte et écouté. Merci pour ton enthousiasme communicatif, cette petite étincelle qui brille toujours, la patience avec laquelle tu m'as expliqué tant de choses, les réunions «petits pains» ou «sorbet framboise» qui ont permis de faire de la JLI's team une équipe soudée dans laquelle il a fait si bon travailler... Merci aussi de m'avoir soutenue dans mon apprentissage de l'enseignement et de m'avoir si bien conseillée. Merci d'avoir été tellement plus qu'un simple directeur de thèse.

Merci à Servane, mon amie... Travailler avec toi a été un tel plaisir, merci d'avoir été aussi patiente, de m'avoir montré les «trucs», les choses à ne pas faire, d'avoir survécu à mon Southern Blot, pour ce quotidien partagé et les p'tits thés qui font du bien... Merci de m'avoir appris à voir le meilleur de la vie et de m'avoir ouvert les portes de la tienne. Il est des rencontres qui changent la vie...

A ma petite Estelle, merci pour ta précieuse amitié, pour ta présence et ton soutien, qu'aurais-je fait sans toi? Merci pour toute ton aide et notamment d'avoir fait de la dissection de larves un moment si agréable. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton intégrité et tout le reste...

Merci à Catherine, de m'avoir si souvent aidée et d'avoir relu ce manuscrit. Je te souhaite bonne continuation...

Merci à Yann, pour ta gentillesse et ton aide. Bonne chance pour la suite.

Merci à Christine d'avoir bien voulu prendre le temps de relire cette thèse. Merci pour tes conseils précieux.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée au long de cette thèse: Maria pour mon initiation à la génétique, Zakaria pour les croisements DmMyD88 et Vincent, mon

«consultant mouches» particulier... Merci à Laurence pour ta gentillesse et ton temps lors de nos journées MALDI-TOF, à Akira pour les expériences de RNAi et à Petros pour les expériences de translocation nucléaire. Merci à Miquette pour les transfections, à Claude pour les séquences, Marie-Céline pour la RT-PCR quantitative, Marie-Eve pour les bactéries, Rachel, Najat, Laure et Raymonde pour le «fly nursing». Merci à tous les autres, toujours disponibles pour répondre à mes questions et me faire profiter de leur expertise!

Merci à Tatiana, pour ce goût partagé du Bordeaux et les excellentes «soirées filles» que nous avons passées! A Vincenze, qui depuis les bancs de la fac me fait rire et m'encourage, à Zaza, pour tous tes conseils et tes supers massages, à Nadège pour les bons souvenirs... Merci à Cécé, avec qui j'ai partagé les angoisses du DEA, à Manue pour ton soutien à mon arrivée au labo. Merci à ma Paulounette, pour tout, de m'avoir maternée et de t'être si bien occupée de moi! Merci à Miquette et Reine pour les p'tites bouffes bien sympas... Merci à Docteur Leclerc pour ta bonne humeur constante et ta gentillesse, j'ai particulièrement aimé sauver la recherche avec toi! Merci à Daniel et Maurice pour les repas inoubliables à la cafet et les anecdotes croustillantes sur la vie des insectes! Daniel, merci aussi pour les discussions sur l'enseignement et tes conseils. Merci à Charles d'avoir si gentiment répondu à mes questions et écouté mes projets d'avenir... Christine, merci pour ton énergie, ta gentillesse et nos papotages! A Julien qui a égayé mes passages en salle à mouches, merci d'être aussi passionné! Merci à Bernard pour ses anecdotes footballistiques qui ont rendu le tri de mouches agréable... Thank you Silvia for having taken care of me when I arrived in the lab, and for the good times we spent together... Merci à Esther d'être devenue mon amie... Merci à toute la «bande de jeunes» du labo, une sacrée bonne équipe! Enfin, merci à tout le monde, vous qui avez rendu ces quatre années si agréables!

To my parents, thank you for giving me the wonderful opportunity of getting here... Thank you for your constant support, for your trust and for guiding me through life... Merci à ma petite sœur, de me montrer chaque jour que les rêves se réalisent si on y croit assez fort. Merci pour ce magnifique cadeau que tu me fais, à nous le Machu Picchu, yeeha!

A toute ma famille extra-pas-ordinaire et à toi Mamie...

Merci Camille, d'avoir fait naître mon envie de me lancer dans cette thèse, de m'avoir encouragée et soutenue, merci pour cette amitié qui nous lie...

A mes chères amies, si précieuses... Merci pour votre présence toujours et les heures de «counselling»... Merci de faire partie de ma vie...

A ma «famille urbaine», sans vous je n'y serais jamais arrivée! Merci d'être toujours là quand j'ai besoin de vous et de me soutenir autant.

A mon Guillaume, qui remplit ma vie de douceur...merci...

Enfin, merci à Johnny Clegg sans qui tout ça ne serait jamais arrivé!

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	4
INDEX DES FIGURES	6
INTRODUCTION.....	8
I La réponse immunitaire de la drosophile.....	10
I.1 La réponse cellulaire.	10
I.1.1 La phagocytose	11
I.1.2 L'encapsulation	12
I.1.3 La mélanisation.....	13
I.2 La réponse humorale.	13
I.2.1 La voie Toll et la détermination de l'axe dorso-ventral de l'embryon.....	14
I.2.2 La voie Toll et la réponse immunitaire	16
I.2.3 La voie IMD de la drosophile.....	17
I.3 La réponse épithéliale	19
II Les TLRs dans la réponse immunitaire innée des mammifères.	22
II.1 Activation des TLRs.....	22
II.2 Signalisation par les TLRs	25
II.3 Rôle des TLRs dans l'immunité adaptative	27
III Le génome de la drosophile code une famille de récepteurs Toll	29
PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	32
RESULTATS.....	33
I DmMyD88, un nouveau composant de la voie Toll impliqué dans la réponse aux bactéries à Gram-positif et aux champignons.....	35
II DmMyD88 est nécessaire pour la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon.	40
III DmMyD88 interagit aussi avec Toll-9	45
III.1 Toll-9 est un homologue structural et fonctionnel des TLRs de mammifères	45
III.1.1 Le domaine TIR de Toll-9 est phylogénétiquement plus proche de celui des TLRs que de celui des autres Tolls de drosophile.	45
III.1.2 Le domaine extracytoplasmique de Toll-9 contient un seul motif C-flank, comme celui des TLRs.....	46
III.1.3 Toll-9 peut réguler l'expression de la <i>drosomycine</i> dans les cellules S2.	46
III.1.4 Toll-9 induit spécifiquement l'expression de <i>drosomycine in vivo</i>	47
III.2 Toll-9 est-il un corécepteur de Toll ou peut-il être activé de façon indépendante?	48
III.3 Etude du phénotype de deux lignées contenant des transposons dans le gène <i>Toll-9</i>	49
III.3.1 La réponse systémique des adultes de la souche PBc05666 est normale.	50
III.3.2 La réponse systémique des larves PBc05666 est sauvage.	50
III.3.3 Analyse de la réponse de la lignée PBc05666 à d'autres pathogènes.	51
III.4 Patron d'expression de Toll-9	52
DISCUSSION	53
I Le complexe récepteur-adaptateur dans les voies Toll et TLR.	55
I.1 Le complexe Toll/DmMyD88/Tube chez la drosophile	55

I.2	Le complexe TLR4/MyD88/Mal chez les mammifères	58
II	Les récepteurs Toll DmMyD88-indépendants de la drosophile.....	60
III	«Pattern recognition» chez la drosophile.....	63
III.1	Les PGRPs.....	63
III.1.1	Activation de Toll après une infection bactérienne à Gram-positif	63
III.1.2	L'activation de la voie IMD dépend d'un membre de la famille des PGRPs.....	64
III.1.3	La drosophile peut reconnaître différents types de peptidoglycane	65
III.2	Rôle de la famille GGBP/GRP dans l'activation de la voie Toll.....	66
III.2.1	Activation de la voie Toll en réponse aux infections fongiques.....	66
III.2.2	GGBP-1 forme un complexe avec PGRP-SA pour activer la voie Toll en réponse aux infections par les bactéries à Gram-positif.	67
III.3	Rôle du TLR de la drosophile, Toll-9, dans la réponse immunitaire.....	67
	ARTICLES DE SYNTHÈSE REDIGES A LA DEMANDE DE L'EDITEUR.....	71
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Mise en place de l'axe dorso-ventral dans l'embryon de drosophile.
Page 14

Figure 2 : Structure des récepteurs à domaine TIR. Page 15

Figure 3 : Voies de régulation des peptides antimicrobiens chez la drosophile.
Page 16

Figure 4 : Représentation schématique de la structure des récepteurs Toll chez la drosophile et l'Homme. Page 22

Figure 5 : Voies de signalisation induites par TLR2, TLR3 et TLR4 chez les mammifères. Page 25

Figure 6 : Le Death Domain de DmMyD88 a un effet dominant-négatif sur l'activation du promoteur de la drosomycine par Toll^{LRR} et Toll-5^{LRR}. Page 38

Figure 7 : Toll-9 est phylogénétiquement plus proche des TLRs que des Tolls.
Page 45

Figure 8 : Alignement de la séquence du motif C-flank de *Toll-9* à la séquence consensus. Page 46

Figure 9 : *Toll-9* active le promoteur du peptide antifongique Drosomycine, mais pas celui du peptide antibactérien Attacine. Page 47

Figure 10 : *Toll-9* active le promoteur de la *drosomycine* via *Tube*, *Pelle* et *DmMyD88*. Page 47

Figure 11 : La surexpression de *Toll-9 in vivo* induit l'expression constitutive de la *drosomycine* via *Pelle*. Page 47

Figure 12 : DmMyD88 interagit spécifiquement avec Toll et Toll-9. Page 48

Figure 13 : *Toll* et *Toll-9* activent le promoteur de la *drosomycine* de façon indépendante. Page 49

Figure 14 : L'allèle *Toll-9*^{PBc05666} est un mutant de *Toll-9*. Page 49

Figure 15 : La réponse immunitaire systémique de la lignée PBc05666 est normale.
Page 50

Figure 16 L'induction de la *défensine* dans les larves PBc05666 semble réduite 6h après infection. Page 50

Figure 17 L'induction de la *drosomycine* semble réduite 6h après infection par *Bacillus megaterium* dans les adultes PBc05666. Page 51

Figure 18 Les séquences 5' non traduites de *Toll-9* dirigent l'expression de la GFP dans les parties antérieure et moyenne de l'intestin moyen des larves. Page 52

Figure 19 *Toll-9* est exprimé dans le tube digestif de larves sauvages. Page 52

Figure 20 Formation du complexe récepteur-adaptateur de la voie Toll. Page 57

Figure 21 Signalisation antimicrobienne MyD88-indépendante chez la drosophile et le nématode. Page 60

INTRODUCTION

La survie de tout organisme dépend de sa capacité à se défendre contre les agents infectieux présents dans son environnement. Les métazoaires ont développé des systèmes immunitaires particulièrement efficaces, puisque les infections sévères ou prolongées sont relativement rares. Parmi ces systèmes, celui de l'immunité innée est le plus universel et le plus rapide. De fait, la survie aux infections de beaucoup d'organismes dépend uniquement des mécanismes de l'immunité innée, puisque seuls les vertébrés ont développé un système immunitaire adaptatif (Beutler, 2004).

La réponse immunitaire adaptative a longtemps été l'enfant chéri des immunologistes car elle fait preuve d'une spécificité remarquable vis-à-vis des agents pathogènes. Elle repose en effet sur l'expansion clonale de lymphocytes capables de reconnaître un antigène précis. Ceci explique le fait qu'elle nécessite un peu de temps à être mise en place et seule, elle serait sans doute submergée si l'infection n'était pas contenue dès les premières heures. D'où la grande importance de la réponse immunitaire innée, moins spécifique mais plus rapide, qui est depuis quelques années l'objet d'un vif intérêt. La rapidité de la mise en place de ce système de défense repose sur la présence à la surface des cellules qui sont aux premières lignes pour détecter le non-soi (cellules dendritiques, macrophages, cellules épithéliales), de récepteurs préformés qui sont ainsi immédiatement activés lorsque le microorganisme pénètre l'hôte. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des motifs structuraux hautement conservés à la surface du pathogène, motifs qui sont à la fois indispensables à la survie du microbe et absents de l'hôte. Ces motifs sont couramment appelés PAMPs pour «*Pathogen-Associated Molecular Patterns*» et de ce fait, on parle de «*Pattern Recognition Receptors*» (PRRs) pour les récepteurs sus-cités (Janeway, 1989).

La nature de ces PRRs a été élucidée grâce à la découverte du rôle clé du récepteur Toll dans la réponse de la drosophile aux infections fongiques ou bactériennes à Gram-positif (Lemaitre et al., 1996). Il existe chez la drosophile une famille de neuf récepteurs Toll, qui fait l'objet de cette thèse. Cette introduction présente les mécanismes de la réponse immunitaire chez la drosophile ainsi que le rôle des Toll-Like Receptors (TLRs) dans la réponse innée des mammifères.

I La réponse immunitaire de la drosophile.

La drosophile, comme tous les invertébrés, est dépourvue de système adaptatif. De plus, la puissance des outils génétiques, moléculaires et biochimiques qui ont été générés par les «drosophilistes» en font un organisme de choix pour étudier la réponse immunitaire innée. Lors d'une infection, la drosophile déclenche un certain nombre de mécanismes de défense, parmi lesquels la phagocytose, l'encapsulation, la mélanisation et la synthèse de peptides antimicrobiens.

I.1 La réponse cellulaire.

La drosophile possède un système circulatoire ouvert qui contient l'hémolymph (l'équivalent du sang des mammifères), pompée par le vaisseau dorsal. L'hématopoïèse de la drosophile donne lieu à trois lignées hématocytaires qui présentent des similarités avec la lignée myéloïde des mammifères.

L'essentiel de la production des cellules sanguines ou hémocytes est assuré par l'organe hématopoïétique qui se développe au stade larvaire. Cet organe, composé de 4 à 6 paires de lobes appelés glandes de la lymphe, disparaît au stade pupal. Chez l'adulte, on ne trouve pas d'organe hématopoïétique, impliquant que les cellules sanguines adultes dérivent des hémocytes larvaires. Ces derniers se répartissent en trois catégories :

- les plasmatoctes sont des petites cellules arrondies douées d'une capacité de phagocytose qui représentent la majorité des hémocytes. D'après leur morphologie et leur fonction, elles peuvent être apparentées à la lignée monocyte/macrophage des mammifères.
- les lamellocytes, de larges cellules qui se différencient à partir des plasmatoctes, responsables de l'encapsulation de corps trop volumineux pour être phagocytés.
- les cellules à cristaux, qui contiennent le substrat et les enzymes nécessaires à la mélanisation, représentent moins de 5% des hémocytes.

Chez l'adulte, on ne trouve que des plasmatoctes en circulation (Lanot et al., 2001; Meister, 2004; Meister and Lagueux, 2003).

1.1.1 La phagocytose

La phagocytose se fait en plusieurs étapes, de l'attachement de la particule ciblée à son internalisation, pour mener finalement à sa destruction à l'intérieur du phagosome. Il est probable que les dernières phases de la phagocytose sont conservées chez les invertébrés et les vertébrés (Pearson et al., 2003; Ramet et al., 2002). Chez la drosophile, les plasmatocytes sont responsables de la phagocytose des cellules apoptotiques mais aussi de celle des bactéries. Il a été montré que lorsqu'on combine des mutants *domino*, qui présentent un défaut de prolifération hémocytaire avec des mutants *Black cell* qui présentent un défaut de mélanisation, on rend les larves beaucoup plus sensibles aux infections bactériennes, mettant ainsi en lumière un rôle des hémocytes dans la réponse immunitaire (Braun et al., 1998). De plus, l'induction des peptides antimicrobiens dans le corps gras (équivalent du foie des mammifères) des larves *domino* est affectée suite à une infection «naturelle» par voie orale, alors qu'elle est normale dans le cas où l'infection résulte d'une blessure. Ces résultats suggèrent que les hémocytes pourraient jouer le rôle de messagers et transmettre une information au corps gras afin de déclencher une réponse systémique en l'absence de blessure physique (Basset et al., 2000). Enfin, chez l'adulte, si l'on sature la fonction phagocytique des hémocytes en injectant des billes de polystyrène dans l'abdomen des mouches, la susceptibilité de mutants de la réponse antibactérienne humorale à des infections par *Escherichia coli* est considérablement augmentée (Elrod-Erickson et al., 2000).

Ces expériences démontrent l'importance des cellules sanguines dans la réponse immunitaire de la drosophile. Par contre, la façon dont les plasmatocytes reconnaissent et internalisent leurs cibles est encore relativement mal comprise. En ce qui concerne la phagocytose des bactéries, il a été montré que le récepteur «scavenger» dSR-C1 est impliqué dans la liaison de bactéries à Gram-positif et négatif quand on le transfecte dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et qu'il joue également un rôle dans la liaison de ces microorganismes aux cellules de la lignée de type macrophage S2 de drosophile (Ramet et al., 2001). Récemment,

un des membres de la famille des PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins), PGRP-LC, a été impliqué dans la liaison des bactéries à Gram-négatif par les cellules S2, mais non dans la liaison des bactéries à Gram-positif (Ramet et al., 2002). Enfin, la drosophile compte dans son génome six gènes codant pour des protéines à thiolester ou TEPs. Trois de ces gènes sont exprimés après infection et *tep1* et *tep4* sont majoritairement exprimés dans les hémocytes (Lagueux et al., 2000). Ces gènes codent pour des protéines similaires à la superfamille des C3/ α 2-macroglobulines du complément. Elles pourraient jouer le rôle d'opsonines pour promouvoir la phagocytose, hypothèse confortée par le fait que chez le moustique *Anopheles gambiae*, la phagocytose de bactéries à Gram-négatif est sévèrement réduite quand la transcription du gène *atep1* est affaiblie (Levashina et al., 2001).

I.1.2 L'encapsulation

L'encapsulation est un phénomène apparemment restreint au monde invertébré et est le fait de cellules particulières, les lamellocytes, que l'on ne trouve que rarement chez la larve saine. Ces cellules se différencient lorsque le pathogène est de taille trop importante pour être phagocyté par les plasmatocytes. Ceci est observé par exemple lors du parasitage par la guêpe *Leptopilina boulardi*, qui pond ses œufs dans de jeunes larves de drosophile (Lanot et al., 2001). Les lamellocytes forment alors une couche cellulaire autour des parasites, constituant ainsi la capsule, qui est ensuite mélanisée. A l'intérieur de la capsule, les parasites sont détruits, soit par asphyxie, soit par la production locale de radicaux libres cytotoxiques (Nappi et al., 1995; Nappi et al., 2000). Il a été montré récemment que le produit du gène *collier* (*col*) est requis pour la différenciation des lamellocytes dans des larves parasitées. En effet, dans des mutants perte de fonction *col*, on ne détecte pas de lamellocytes dans l'hémolymphe après parasitage par *L.boulardi* et on n'observe pas d'encapsulation du parasite (Crozatier et al., 2004). *Col* code l'homologue du facteur de mammifère EBF (Early B-cell factor), un facteur contrôlant la lymphopoïèse des cellules B. Collier est à ce jour la seule molécule ayant été impliquée dans la différenciation des lamellocytes dans la larve de drosophile.

I.1.3 La mélanisation

La rupture de la cuticule à la suite d'une blessure ou d'une infection microbienne déclenche rapidement le processus de mélanisation, caractérisé par la production d'un pigment noir résultant de la conversion de tyrosine en mélanine (pour revue, Söderhäll and Cerenius, 1998). Une enzyme clé de la cascade biochimique aboutissant à la mélanisation est la phénoloxydase (PO), qui catalyse la conversion de phénols en quinones. Celles-ci peuvent alors polymériser pour former la mélanine. La PO existe sous forme de zymogène inactif, la prophénoloxydase ou ProPO. La ProPO est stockée sous forme cristalline dans le cytoplasme des cellules à cristaux. Sa conversion en PO est catalysée par une cascade protéolytique dont la sérine protéase terminale est appelée PPAE pour Prophenoloxidase Activating Enzyme. La PPAE de nombreux insectes a été identifiée, mais on ne la connaît pas encore chez la drosophile. Chez cet insecte, deux études ont montré récemment le rôle de la serpine (inhibiteur de sérine protéases) Spn27A dans la restriction de l'activité de la PO au site de blessure ou d'infection. Cette restriction s'opère certainement *via* l'inhibition spécifique de la PPAE de drosophile (De Gregorio et al., 2002a; Ligoxygakis et al., 2002c).

I.2 La réponse humorale.

La facette de la réponse immunitaire de la drosophile la plus étudiée et la mieux comprise à ce jour est la synthèse par le corps gras, l'équivalent du foie des mammifères, d'une batterie de puissants peptides antimicrobiens. Suite à une infection, la concentration globale de ces peptides dans l'hémolymphe peut atteindre 300 μ M (Bulet et al., 1999). Il y a chez la drosophile sept classes de peptides antimicrobiens, des petits peptides cationiques qui peuvent être classés en trois groupes selon leur spectre d'activité : la Drosomycine et la Metchnikowine sont essentiellement antifongiques (Fehlbaum et al., 1994; Levashina et al., 1995), la Défensine est active contre les bactéries à Gram-positif, tandis que les Cécropines, la Drosocine, les Attacines et les Diptéricines sont des peptides actifs

contre les bactéries à Gram-négatif (Bulet et al., 1999; Ekengren and Hultmark, 1999). Le mode d'action de ces peptides est encore assez mal compris, mais de par leur nature cationique et amphipathique, leur action est essentiellement dirigée contre la membrane des microorganismes (pour revue, voir Lehrer and Ganz, 1999). L'importance des peptides antimicrobiens pour combattre l'infection a été illustrée par une étude réalisée par l'équipe de Bruno Lemaître. Cette étude montre qu'en exprimant de façon constitutive un des peptides dans des mouches déficientes pour les deux voies de signalisation contrôlant leur expression, on restaure la résistance à l'infection correspondante (Tzou et al., 2002).

L'étude de la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens a permis de caractériser deux voies de transduction du signal, la voie Toll et la voie IMD. Cette étude a commencé par une analyse classique des promoteurs des peptides antimicrobiens au début des années 90. Elle a révélé l'existence dans ces promoteurs de séquences κ B permettant la fixation des facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B. A ce moment-là, la seule protéine Rel connue chez la drosophile était Dorsal, identifiée pour son rôle dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon de drosophile (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984).

1.2.1 La voie Toll et la détermination de l'axe dorso-ventral de l'embryon

Le premier facteur de transcription de type Rel/NF- κ B identifié chez la drosophile, Dorsal, fut identifié au cours d'un crible visant à identifier les gènes impliqués dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon de drosophile (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984). Outre Dorsal, ce crible permit l'identification de onze autres gènes dont la mutation entraîne la dorsalisation ou la ventralisation de l'embryon (Figure 1). Parmi ces gènes, on trouve celui codant le récepteur Toll («fantastique» en allemand) qui doit son nom au fait que des mutations perte de fonction de *Toll* entraînent une dorsalisation de l'embryon, tandis que des mutations gain de fonction du même gène provoquent la ventralisation de l'embryon.

Le gène *Toll* code un récepteur transmembranaire de type 1. Son domaine extracytoplasmique est composé de répétitions riches en leucine (LRRs pour

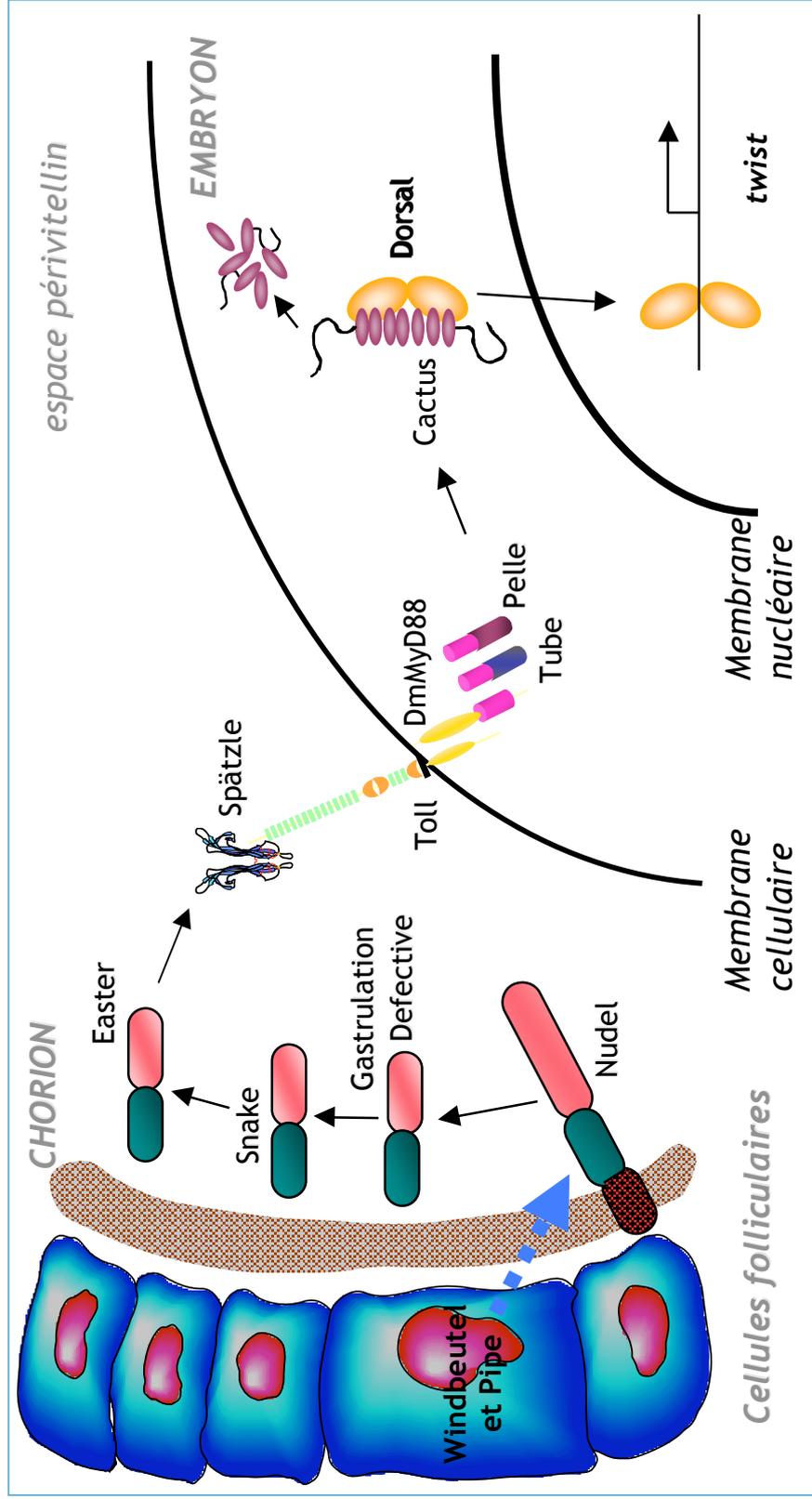
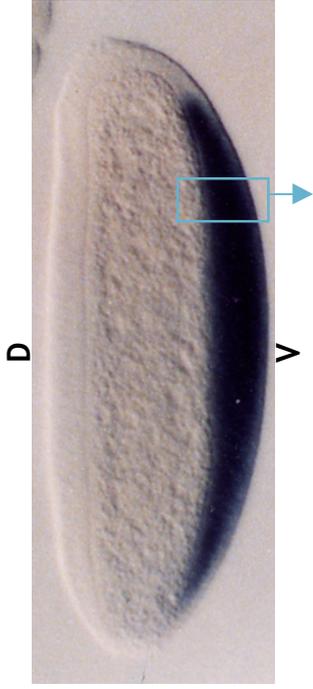
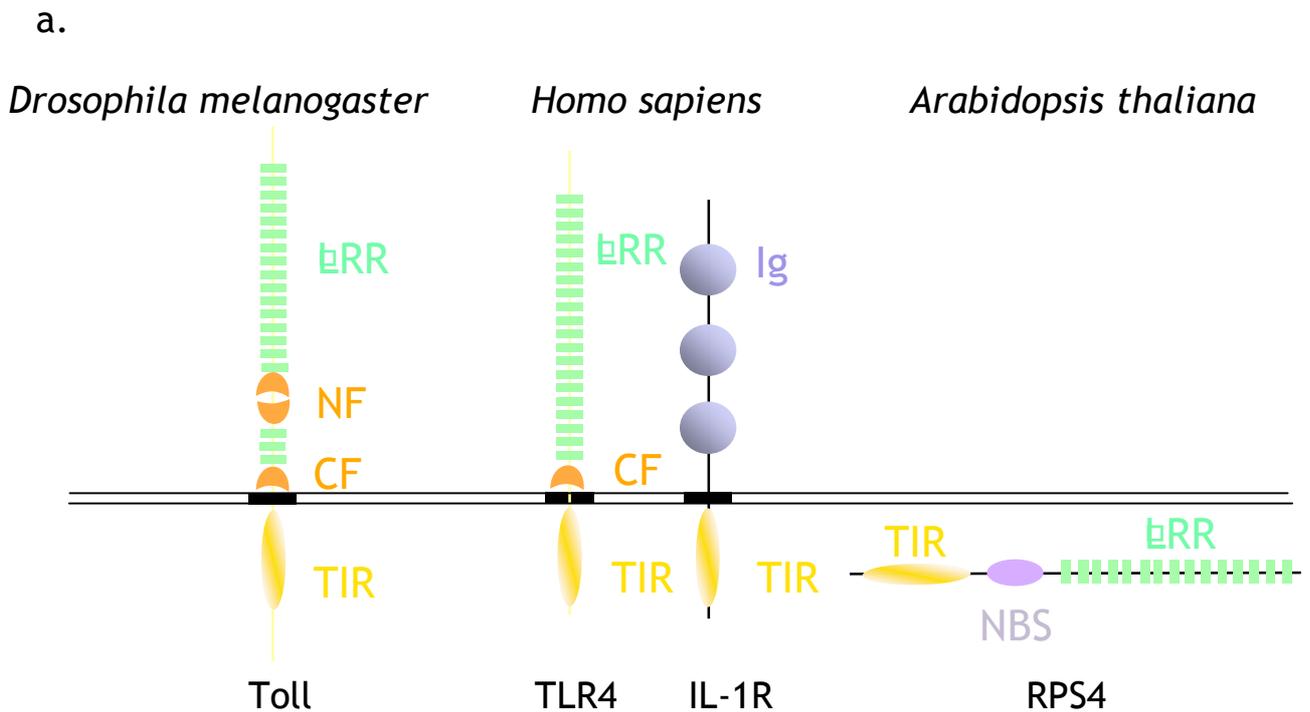


Figure 1. Mise en place de l'axe dorso-ventral dans l'embryon de drosophile. La photo montre un embryon de drosophile après hybridation *in situ* avec une sonde correspondant au gène *twist*. Les protéines Windbeutel et Pipe des cellules folliculaires induisent l'activation de la cascade protéolytique incluant Nudel, Gastrulation Defective, Snake et Easter. Cette cascade aboutit au clivage de Spätzle dans l'espace périvitellin. La forme active de Spätzle se lie à Toll. Toll, par l'intermédiaire des adaptateurs DmMyD88, Tube et de la kinase Pelle, déclenche la phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur Cactus. Le facteur de transcription de type NF- κ B, Dorsal, passe alors dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles comme par exemple *twist*. Le facteur DmMyD88 est décrit dans la partie Résultats de ce manuscrit. D: face dorsale de l'embryon, V: face ventrale de l'embryon.

Leucine Rich Repeats). Le motif LRR fut décrit pour la première fois en 1985 comme une séquence répétée de 24 résidus, caractérisée par la présence de résidus hydrophobes typiquement espacés. On retrouve ces LRRs dans la partie extracytoplasmique des TLRs de mammifères (voir plus loin), mais aussi dans d'autres molécules comme l'inhibiteur de ribonucléase RI, le récepteur plaquettaire CD42b ou la protéine de levure SDS22. Les motifs LRRs sont flanqués par des motifs riches en cystéines du côté amino-terminal (NF ou motif N-flank) et carboxy-terminal (CF ou motif C-flank). Le domaine intracytoplasmique de Toll est partagé par les membres de la famille du récepteur de l'Interleukine-1 (IL-1R), d'où son nom de domaine TIR (Toll/IL-1R). On le retrouve également dans de nombreuses protéines de résistance des plantes (Figure 2).

Le récepteur Toll est activé par la liaison de son ligand Spätzle (Weber et al., 2003), apparenté aux cytokines à nœud de cystéine, comme les facteurs de neurotrophines (Mizuguchi et al., 1998). Spätzle est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 41kD et son clivage, résultant de l'activation de la cascade protéolytique, produit la forme active constituée des 106 acides aminés carboxy-terminaux (DeLotto and DeLotto, 1998). Spätzle est clivé dans le liquide périvitellin à la suite de l'activation d'une cascade protéolytique qui implique les sérine protéases Nudel, Gastrulation defective, Snake et Easter (LeMosy et al., 1999). L'activation de cette cascade dépend de la fixation d'une chaîne de protéoglycane à Nudel impliquant les protéines Windbeutel et Pipe (Schupbach and Wieschaus, 1989; Sen et al., 1998). Il a été montré récemment que la serpine Spn27A est impliquée dans le contrôle de cette cascade protéolytique (Hashimoto et al., 2003; Ligoxygakis et al., 2003). Lorsque Spätzle est finalement clivé par Easter, il se lie à Toll et active le récepteur (DeLotto and DeLotto, 1998; Weber et al., 2003).

Lorsque le récepteur Toll est activé, il s'associe à un complexe formé des protéines Tube, Pelle et DmMyD88. Tube est une protéine de 50kD comportant un Death Domain (DD) amino-terminal et une région carboxy-terminale caractérisée par cinq répétitions d'un motif octapeptidique, appelées Tube Repeats (TR) (Letsou et al., 1991). Pelle est un homologue de la kinase des mammifères IRAK (IL-1R Associated Kinase) et possède également un DD amino-terminal, ainsi qu'un domaine sérine/thréonine kinase carboxy-terminal (Shelton and Wasserman, 1993). Enfin, je décris dans la partie Résultats de ce manuscrit une autre molécule du



b.

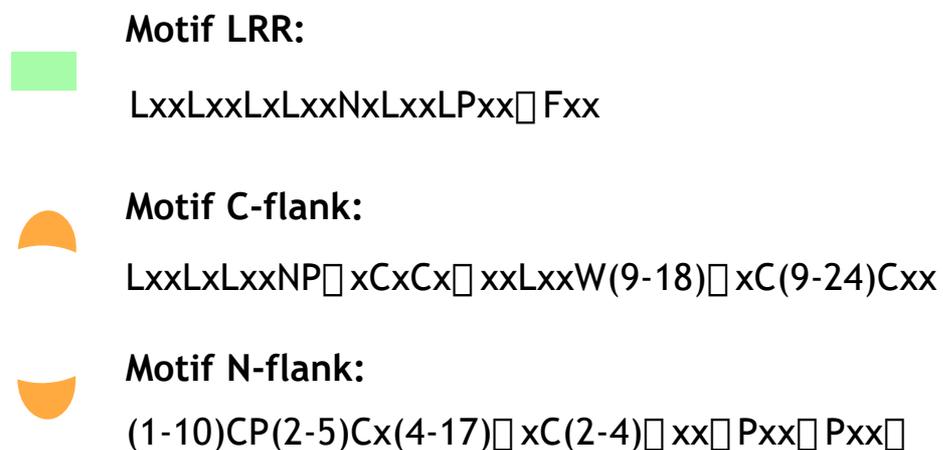


Figure 2. Structure des récepteurs à domaine TIR. a. Comparaison des récepteurs à domaine TIR chez la drosophile (Toll), chez les mammifères (TLR4 et IL-1R) et les plantes (RPS4). TIR : Toll/IL-1R/R, LRR : Leucin Rich Repeats, NF/CF : Motif N/C-flank riche en cystéine, Ig : Domaine Immunoglobuline, NBS : Nucleotide Binding Site. b. Séquences consensus des motifs LRR, NF et CF. □ : résidu hydrophobe, x : acide aminé.

complexe Toll/Tube/Pelle, DmMyD88. DmMyD88 est caractérisée par un DD amino-terminal et un domaine TIR carboxy-terminal (voir Résultats). Les interactions entre les différents composants du complexe récepteur-adaptateurs seront abordées dans la discussion de ce manuscrit.

L'activation de ce complexe conduit à la phosphorylation et à la polyubiquitination de l'inhibiteur Cactus, un homologue des protéines de mammifère inhibitrices de NF- κ B, I κ B. Une fois polyubiquitiné, Cactus est dégradé par le protéasome (pour revue, Belvin and Anderson, 1996). Ceci permet à Dorsal de passer dans le compartiment nucléaire où il contrôle la transcription d'un certain nombre de gènes cibles.

La présence de sites Rel/ κ B dans les promoteurs des peptides antimicrobiens suggérait que Dorsal pouvait être réutilisé chez la mouche adulte au cours de la réponse immunitaire.

1.2.2 La voie Toll et la réponse immunitaire

De façon surprenante, il s'avéra que la réponse immunitaire était normale dans les mutants *dorsal* (Reichhart et al., 1993). Cependant, au même moment, Dif (Dorsal-related immune Factor), une seconde molécule apparentée à NF- κ B contrôlée par Cactus, fut identifiée dans le groupe de M. Levine (Ip et al., 1993). L'étude des mutants *Dif* a montré que ce facteur est essentiel pour le contrôle de l'induction de la drosomycine et pour la résistance aux infections fongiques ou bactériennes à Gram-positif (Rutschmann et al., 2000a; Rutschmann et al., 2002).

Des études menées au laboratoire ont montré également que certains des gènes impliqués dans la voie Toll de l'embryon sont nécessaires lors de la réponse immunitaire. En effet, la cassette de gènes *spätzle/toll/tube/pelle/cactus* contrôle la réponse antifongique de la drosophile et notamment l'expression du peptide antifongique Drosomycine (Lemaitre et al., 1996). Les mouches déficientes pour *spätzle*, *toll*, *tube* ou *pelle* sont sensibles aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif, tandis que les individus déficients pour *cactus* expriment la *drosomycine* de façon constitutive. Je présente dans la partie Résultats de ce manuscrit les données montrant que DmMyD88 est également impliqué dans la voie Toll lors de la réponse immunitaire (Figure 3).

Les sérine protéases conduisant au clivage de Spätzle lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon ne sont pas réutilisées lors de la réponse immunitaire. Cependant, d'autres sérine protéases sont impliquées, puisque les mutants *necrotic (nec)*, déficients pour la serpine Spn43Ac, sont caractérisés par un clivage constitutif de Spätzle et une expression constitutive de *drosomycine* en absence d'infection (Levashina et al., 1999). De plus, la sérine protéase Perséphone a été récemment décrite comme agissant en amont de Spätzle et sera évoquée dans la discussion de ce manuscrit, ainsi que d'autres gènes agissant eux aussi en amont de *spätzle*, *semmelweis*, *osiris* et *hadès* (Gobert et al., 2003; Gottar et al., 2004; Ligoxygakis et al., 2002b; Michel et al., 2001).

Comme mentionné ci-dessus, Dorsal ne semble pas impliqué dans la réponse immunitaire. Néanmoins, chez la larve, Dorsal peut se substituer à Dif et induire l'expression de la *drosomycine*, suggérant que ces facteurs de transcription requièrent des cofacteurs différents lors de la réponse immunitaire chez la larve et chez l'adulte (Petersen et al., 1995). Enfin, *dorsal* est exprimé dans le corps gras adulte et son expression augmente suite à une blessure septique (Lemaitre et al., 1995b), ce qui pourrait signifier qu'il est impliqué dans la régulation de l'expression d'autres gènes cibles de la voie Toll parmi celles identifiées au cours d'études biochimiques (Uttenweiler-Joseph et al., 1998) ou utilisant des puces à ADN (De Gregorio et al., 2001; De Gregorio et al., 2002b; Irving et al., 2001).

Les gènes codant les peptides antibactériens tels que la Diptéricine ou l'Attacine, dont les promoteurs contiennent également des sites κ B, sont induits de façon Toll-indépendante. Des expériences de génétique menées au laboratoire ont permis l'identification d'une seconde voie de signalisation, la voie IMD pour Immune Deficiency (Lemaitre et al., 1995a). Cette voie contrôle l'activité de Relish, la troisième protéine apparentée aux facteurs Rel/NF- κ B codée par le génome de la drosophile.

1.2.3 La voie IMD de la drosophile

L'étude du phénotype des mutants *relish* a montré que ce facteur de transcription est lui aussi impliqué dans la réponse immunitaire de la drosophile. En

effet, il affecte la réponse aux infections par des bactéries à Gram-négatif, tandis que la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif est sauvage (Hedengren et al., 1999). L'expression des peptides antibactériens Diptéricine et Attacine est abolie dans les mutants *relish* et ces mutants sont particulièrement sensibles à des infections par des bactéries à Gram-négatif. Relish est similaire aux protéines Rel p105 et p100 des mammifères et comprend un domaine Rel amino-terminal et un domaine inhibiteur I κ B carboxy-terminal composé de répétitions de motifs ankyrines. Relish subit un clivage endoprotéolytique qui permet au domaine Rel/NF- κ B de passer dans le noyau et d'activer ses gènes cibles tandis que le domaine inhibiteur reste dans le cytoplasme (Stöven et al., 2000). Ce clivage endoprotéolytique est dépendant de la caspase Dredd (Elrod-Erickson et al., 2000; Leulier et al., 2000), homologue de la caspase humaine Caspase-8 et impliquée dans l'apoptose (Chen et al., 1998). En effet, les mutants *dredd* sont incapables de cliver Relish et les deux protéines peuvent être co-immunoprécipitées (Stöven et al., 2003). Toutefois, le clivage de Relish par Dredd n'a pas pu être réalisé *in vitro*, suggérant que d'autres protéines pourraient être nécessaires.

La voie en amont de Relish est composée du signalosome, qui regroupe les homologues de la kinase IKK α (I κ B Kinase α) et de la sous-unité régulatrice IKK β /NEMO (I κ B Kinase β /NEMO). Les mouches déficientes pour IKK α (*ird5*) ou pour IKK β (*kenny*) sont sensibles à des infections par des bactéries à Gram-négatif, mais sont résistantes aux infections fongiques ou bactériennes à Gram-positif (Lu et al., 2001; Rutschmann et al., 2000b). Des expériences biochimiques ont montré que DmIKK α peut phosphoryler Relish (Silverman et al., 2000). Il apparaît ainsi que la phosphorylation de Relish mène à son clivage endoprotéolytique et à son activation. L'homologue de TAK1 (Transforming Growth Factor- β Activated Kinase), DmTAK1, une MAPKKK (MAP3K), fonctionne en amont de ce signalosome et est nécessaire à la synthèse des peptides antibactériens (Vidal et al., 2001).

La molécule la plus en amont est la protéine IMD. Le nom de la voie de signalisation provient de l'étude du phénotype de mutants *imd* (immune deficiency), caractérisés en 1995, dans lesquels la réponse antibactérienne, mais pas antifongique, est compromise (Lemaître et al., 1995a). *imd* code pour une protéine comportant un Death Domain (DD) homologue à celui de la protéine de mammifère RIP (Receptor Interacting Protein) qui interagit avec le récepteur du

TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) (Georgel et al., 2001; Hsu et al., 1996). IMD interagit avec dFADD (Leulier et al., 2002; Naitza et al., 2002), l'homologue de FADD (Fas Associated Death Domain Protein) qui comporte un DD et un Death Inducing Domain (DID) (Hu and Yang, 2000). Ce DID permet l'interaction de dFADD avec la caspase Dredd (Horng and Medzhitov, 2001; Hu and Yang, 2000). Ainsi, IMD, dFADD et Dredd pourraient faire partie d'un même complexe, impliqué dans la réponse aux infections par des bactéries à Gram-négatif et agissant en aval du ou des récepteurs de la voie (Figure 3).

Récemment, il a été montré que l'un des membres de la famille des Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs), PGRP-LC, agit comme un récepteur de la voie IMD (Choe et al., 2002; Gobert et al., 2003; Ramet et al., 2002). Il sera évoqué plus longuement dans la discussion de ce manuscrit.

Ainsi, la voie IMD est composée d'homologues de molécules impliquées dans la voie IL-1/TLR (TAK1), dans la voie TNF- α (Caspase-8, RIP, FADD) ou dans les deux (IKK α , IKK β , NF- κ B). Comme c'est le cas pour la voie induite par le TNF- α , la voie IMD induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B, mais induit également l'apoptose. En effet, la surexpression d'*imd* dans les mouches induit l'expression du gène pro-apoptotique *reaper*. Ce phénomène peut être bloqué par la surexpression de l'inhibiteur d'apoptose *p35* (Georgel et al., 2001).

1.3 La réponse épithéliale

Les peptides antimicrobiens sont produits par le corps gras lors d'une infection systémique, mais peuvent aussi être exprimés par les épithélia dans le cadre d'une réponse immunitaire locale. La synthèse locale de peptides antimicrobiens apparaît comme une forme d'immunité hautement conservée à travers l'évolution, puisque les tissus épithéliaux d'un certain nombre d'espèces de plantes expriment des défensines (Thomma and Broekaert, 1998). De même, chez les mammifères, les cellules épithéliales de la peau et des tractus respiratoire, digestif et génito-urinaire synthétisent des peptides antimicrobiens (revu dans (Huttner and Bevins, 1999; Lehrer and Ganz, 1999)).

Chez la drosophile, il a été montré en utilisant des lignées transgéniques portant la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle des promoteurs des

différents peptides antimicrobiens, que ceux-ci peuvent être activés suite à une infection dans des tissus potentiellement en contact avec l'extérieur : le tractus respiratoire, la région orale et le tractus digestif, les tubules de Malpighi et les tractus reproductifs mâle et femelle (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2002). Ces tissus sont le lieu d'importants processus physiologiques impliquant une interaction avec le milieu extérieur et dans lesquels les cellules sont susceptibles d'être en contact avec des microorganismes. De façon intéressante, l'expression locale des peptides est conservée dans des mutants de la voie Toll, en particulier celle de la *drosomyicine*, dont l'expression systémique est abolie dans ces mêmes mutants (Ferrandon et al., 1998). Par contre, l'étude de la réponse locale dans les mutants *imd* a montré le rôle important de cette voie de signalisation dans l'expression de ces peptides : par exemple, on ne trouve pas d'expression de *drosomyicine* et de *metchnikowine* dans les trachées après infection dans des mutants *imd*, alors que leur expression systémique dans le corps gras reste normalement inductible (Tzou et al., 2000). De plus, le gène *imd* est requis pour l'expression locale de la *cécropine* au niveau de l'épiderme larvaire (Onfelt Tingvall et al., 2001).

L'analyse de la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens au niveau épithélial révèle l'existence d'un niveau supplémentaire de complexité. Ainsi, des peptides régulés de façon identique dans le corps gras au cours de la réponse systémique, comme la Diptéricine et la Drosocine, sont induits dans des tissus épithéliaux distincts, le tube digestif pour la Diptéricine et les trachées pour la Drosocine. Ceci implique l'existence de facteurs tissu-spécifiques agissant de concert avec le facteur de transcription de la voie IMD, Relish. Ceci est conforté par le fait que le facteur de transcription GATA codé par le gène *serpent* régule l'expression de certains peptides comme la Cécropine dans le corps gras larvaire (Tingvall et al., 2001). De plus, le promoteur de certains peptides antimicrobiens contient un motif R1 à proximité de la séquence Rel/NF- κ B, qui contribue à la forte expression des gènes codant ces peptides. Cette séquence pourrait également contribuer à leur expression tissu-spécifique (Uvell and Engstrom, 2003). L'identité du facteur de transcription se liant à ce motif est encore inconnue.

Dans certains tissus, l'expression des peptides antimicrobiens est constitutive. De façon intéressante, l'expression constitutive de *drosomyicine* dans

les glandes salivaires et de *cécropine* dans le canal éjaculateur dépend du produit du gène homéotique *Caudal* (Ryu et al., 2004). Par contre, l'expression constitutive de *drosomyicine* dans le tractus génital femelle ne dépend pas de ce gène.

Ainsi, on peut définir jusqu'à quatre types de régulation pour l'expression de la *drosomyicine* : Toll-dépendante dans le corps gras, IMD-dépendante dans les trachées, *Caudal*-dépendante dans les glandes salivaires et par un mécanisme qui reste à déterminer dans le tractus génital femelle.

II Les TLRs dans la réponse immunitaire innée des mammifères.

La découverte du rôle de Toll dans la réponse antifongique de la drosophile (Lemaitre et al., 1996) incita la recherche de récepteurs homologues chez les mammifères. C'est ainsi qu'à l'heure actuelle, une famille de 10 Toll-like Receptors (TLRs) a été identifiée chez les mammifères : TLR1-10 chez l'Homme (Figure 4), TLR1-9 et 11-12 chez la souris. Comme Toll, les TLRs possèdent un domaine TIR intracytoplasmique et leur domaine extracytoplasmique est formé de motifs LRRs. Ils ne possèdent qu'une région riche en cystéine, du côté carboxy-terminal (C-flank). Les TLRs forment une super-famille avec les membres de la famille de récepteurs à l'Interleukine-1 (IL-1R) qui ont également un domaine TIR intracytoplasmique mais dont l'ectodomaine est composé de trois domaines Immunoglobuline (Figure 2). Cette différence explique le fait que les TLRs et les membres de la famille IL-1R activent des cibles communes en réponse à des ligands différents.

II.1 Activation des TLRs

En 1997, Medzhitov et Janeway suggérèrent que TLR4 (appelé alors «human Toll») était impliqué dans la réponse immunitaire des mammifères (Medzhitov et al., 1997). Mais la découverte qu'il pouvait agir comme un PRR vint un an plus tard, lorsque fut identifiée la mutation responsable de la résistance au choc septique induit par le LPS dans des souris C3H/HeJ. En effet, il s'agit d'une mutation non-sens qui résulte en la substitution d'une proline en histidine dans la région intracytoplasmique de TLR4. Le rôle de TLR4 dans la réponse au LPS fut confirmé par la génération de souris déficientes pour *tlr4*, qui sont résistantes au choc septique induit par le LPS (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

De nombreuses études ont montré l'implication des TLRs dans la reconnaissance d'une grande variété de ligands : TLR2 est nécessaire pour la reconnaissance d'un grand nombre de ligands, parmi lesquels le Peptidoglycane

(PGN), les lipopeptides bactériens (Takeuchi et al., 2001; Yoshimura et al., 1999) et le zymosan (Underhill et al., 1999), TLR3 est impliqué dans la réponse à l'ARN double-brin (Alexopoulou et al., 2001) ; outre le LPS, TLR4 peut être activé par la protéine F du virus syncytial respiratoire (RSV) (Kurt-Jones et al., 2000). TLR5 est impliqué dans la réponse à la flagelline bactérienne (Hayashi et al., 2001), TLR7 et TLR8 humain dans la réponse à l'ARN simple brin (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004) ainsi qu'à des composants synthétiques de la famille des imidazoquinolines (Hemmi et al., 2002) et TLR9 dans la réponse aux motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien (Hemmi et al., 2000). Enfin, une étude a récemment montré que le récepteur murin TLR11 est impliqué dans la réponse aux bactéries uropathogènes (Zhang et al., 2004). Ce vaste répertoire peut être élargi par un certain degré de coopération entre les TLRs (Ozinsky et al., 2000). En effet, TLR2 s'associe avec TLR6 pour reconnaître le lipopeptide mycoplasma diacylé MALP-2 (Takeuchi et al., 2001), tandis qu'il s'associe avec TLR1 pour reconnaître des lipopeptides triacylés (Takeuchi et al., 2002).

La façon dont les TLRs reconnaissent des ligands aussi différents reste encore assez mal comprise. Néanmoins, de nombreuses études sur l'interaction entre TLR4 et le LPS ont permis de mieux comprendre comment ce composant est détecté par l'organisme et comment cette détection mène à l'activation de TLR4. La reconnaissance du LPS nécessite en plus de TLR4 trois cofacteurs : une protéine sérique, LPS Binding Protein (LBP), une protéine à LRR, CD14 et enfin la molécule MD-2. Lorsque le LPS est présent dans l'organisme, sa portion lipidique, le Lipide A, se lie à la protéine LBP (Tobias et al., 1995) qui transfère le LPS à la molécule CD14 (Schumann et al., 1990). CD14 est une glycoprotéine qui peut exister sous deux formes : liée à la membrane par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol) ou présente dans la circulation sous forme soluble (Wright et al., 1990). Les souris déficientes pour *cd14* sont résistantes aux effets létaux du LPS (Haziot et al., 1996), mais sont toujours capables d'induire les gènes codant pour les protéines de la phase aiguë en réponse à de fortes concentrations en LPS (Haziot et al., 1998). Les souris déficientes pour *md-2* ne répondent pas au LPS, sont résistantes au choc septique induit par le LPS et sont susceptibles à des infections par des bactéries à Gram-négatif, montrant que MD-2 est un composant essentiel et indispensable du complexe récepteur au LPS (Nagai et al., 2002). MD-2 s'associe à TLR4 dans le

reticulum endoplasmique et est nécessaire pour la glycosylation de TLR4 qui lui permet d'être localisé à la membrane cellulaire (revu dans (Miyake, 2004)). MD-2 peut lier le LPS directement (Viriyakosol et al., 2001), mais avec une affinité moindre que le complexe TLR4/MD-2 (Akashi et al., 2003). Bien que l'interaction du LPS avec MD-2 ne requiert pas CD14, la présence de CD14 membranaire est nécessaire à l'interaction du LPS avec le complexe TLR4/MD-2. CD14 semble jouer un rôle dans le transfert du LPS au complexe TLR4/MD-2 (Akashi et al., 2003). Ce complexe peut donc lier le LPS et activer la voie de signalisation en aval, activation qui nécessite l'oligomérisation de TLR4 (Saitoh et al., 2004). Deux hypothèses peuvent être formulées quant à cette oligomérisation (Gangloff and Gay, 2004) : soit la liaison du LPS à MD-2 provoque un changement conformationnel facilitant le recrutement d'un deuxième récepteur TLR4, soit le LPS est lié par deux molécules MD-2, provoquant le pontage de deux molécules TLR4. Malgré les études récentes montrant une interaction physique entre le LPS et le complexe TLR4/MD-2, la façon précise dont se fait cette interaction reste encore à déterminer, notamment en ce qui concerne le rôle exact de TLR4.

Il a été montré récemment qu'une forme soluble du récepteur TLR2 (sTLR2) se lie directement au Peptidoglycane par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire et que CD14 facilite cette interaction (Iwaki et al., 2002). De plus, sTLR2 est également capable de lier directement le zymosan (Sato et al., 2003). Enfin, un article publié récemment montre, grâce à la technique du Biacore, qu'un plasmide contenant de l'ADN CpG non méthylé se lie au récepteur TLR9 murin de façon spécifique (Cornelie et al., 2004). De même, Hermann Wagner rapporte que TLR9 recombinant lie directement et de façon pH-dépendante l'ADN CpG non méthylé dans un système Biacore (Wagner, 2004). L'importance du pH reflète certainement le fait que la reconnaissance de son ligand par TLR9 se fait au niveau du compartiment lysosomal de la cellule après internalisation de l'ADN (Latz et al., 2004). D'autres études seront toutefois nécessaires pour étendre la notion d'interaction directe à toutes les interactions pathogènes-TLRs. Une des difficultés de cette tâche provient du fait que la purification de PAMPs microbiens est délicate et que les risques de contaminations demeurent importants.

D'autres études ont montré que certains TLRs pouvaient être activés par des ligands endogènes comme par exemple des protéines de choc thermique ou des

fragments de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes, l'acide hyaluronique ou le domaine A de la fibronectine (revu dans (Beg, 2002)). Toutefois, aucune interaction biochimique n'a pu être démontrée à ce jour entre un TLR et un ligand endogène et une contamination par d'autres composants bactériens reste probable, d'autant plus que ces ligands endogènes semblent activer préférentiellement TLR2 et TLR4, qui sont impliqués dans la réponse au LPS et aux lipoprotéines. Toutefois, si cette interaction venait à être confirmée, elle soutiendrait le «*modèle du danger*» proposé par Matzinger (Matzinger, 1994). Selon ce modèle, le système immunitaire est activé non seulement en réponse au non-soi, mais aussi en réponse au soi stressé ou endommagé.

II.2 Signalisation par les TLRs

La voie de signalisation activée par la majorité des TLRs est commune aux récepteurs de l'IL-1 et aboutit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP1 (Figure 5).

La présence d'un domaine TIR dans les TLRs et dans l'adaptateur MyD88 permet une interaction homotypique entre ces deux molécules. Cette interaction permet le recrutement des kinases IRAK1 et IRAK4. IRAK4 peut phosphoryler IRAK1, ce qui conduit à l'autophosphorylation d'IRAK1. L'hyperphosphorylation d'IRAK1 provoque son détachement du complexe récepteur/adaptateur et son interaction avec TRAF6 (revu dans (Suzuki et al., 2002)). En effet, IRAK1 possède des motifs de liaison à TRAF6 (Cao et al., 1996). La transition entre TRAF6 et l'activation du complexe IKK reste encore incertaine. Il a été montré qu'un complexe formé de TRAF6 et de deux protéines d'ubiquitination, Ubc13 et Uev1A, permet l'activation du complexe TAK1-TAB1-TAB2 (Deng et al., 2000; Wang et al., 2001). TAK1 activerait ensuite les kinases IKK α et MKK6 (Wang et al., 2001). Toutefois, l'importance de l'ubiquitination de TRAF6 et du complexe TAK1 pour la transduction du signal reste à établir *in vivo* dans un modèle de souris Knock-Out (KO).

IKK α appartient au complexe signalosome IKK formé des kinases IKK α et IKK β , ainsi que de la sous-unité régulatrice IKK γ /NEMO. La phosphorylation de l'inhibiteur I κ B par le complexe IKK résulte en sa dégradation par le protéasome

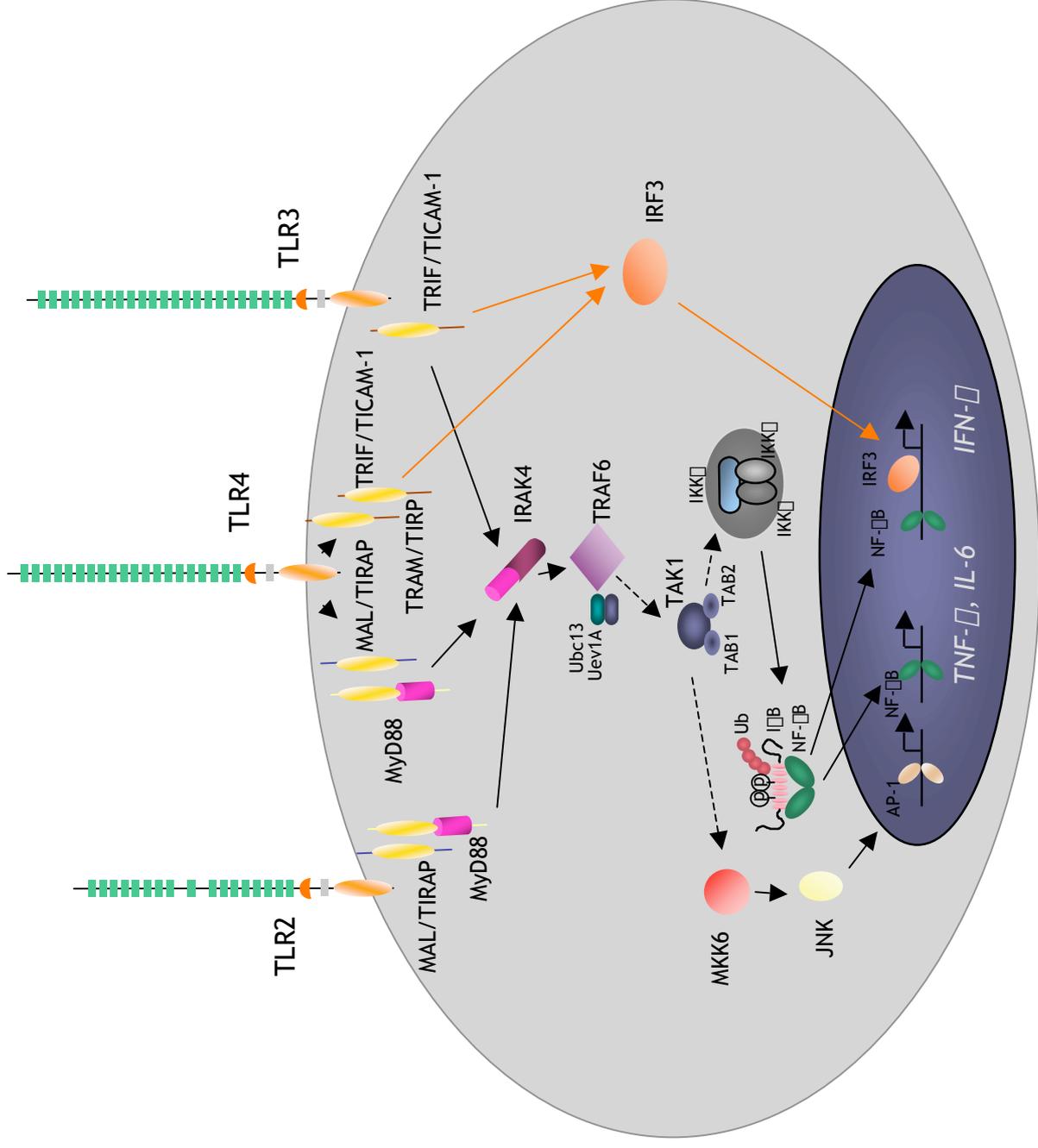


Figure 5. Voies de signalisation induites par TLR2, TLR3 et TLR4 chez les mammifères. Voir le texte pour les détails. Les flèches en pointillés reflètent le fait qu'il reste des incertitudes quant à la transduction du signal entre TRAF6 et le signalosome IKK.

(Ben-Neriah, 2002), permettant ainsi au facteur de transcription NF- κ B de passer dans le noyau et d'activer les promoteurs de ses gènes cibles. De son côté, MKK6 phosphoryle la kinase JNK, conduisant à l'activation du facteur de transcription AP1 (Figure 5). AP1 et NF- κ B induisent la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation (cytokines, sélectine-E, ...), dans la réponse adaptative (CD40, CD80, CD86), mais aussi celle de gènes codant pour des molécules effectrices comme iNOS (inducible nitric oxide synthase) ou des peptides antimicrobiens, qui peuvent directement détruire les pathogènes (Thoma-Uszynski et al., 2001).

Lorsque des souris déficientes pour *MyD88* furent générées et étudiées, il apparut que l'induction de NF- κ B en réponse au LPS ou au dsRNA n'est pas abolie dans ces souris, mais seulement retardée, impliquant l'existence d'une voie de signalisation MyD88-indépendante en aval de TLR4 et TLR3 (Hoebe et al., 2003a; Kawai et al., 2001; Yamamoto et al., 2003a). Ceci n'est pas le cas pour les autres TLRs, puisque toute réponse aux agonistes de TLR2, TLR5 ou TLR9 est abolie dans des mutants *MyD88*^{-/-}. De plus, TLR3 et TLR4 peuvent activer le facteur de transcription IRF3 et induire la production de la cytokine IFN α (Interféron α) en l'absence de MyD88 (Kawai et al., 2001). Ceci a conduit à la recherche d'autres adaptateurs responsables de la voie de signalisation MyD88-indépendante. Le premier adaptateur ainsi étudié est Mal/TIRAP (MyD88 Adaptor Like/TIR domain containing adaptor). L'étude de souris KO pour Mal/TIRAP a montré que cet adaptateur est en fait un cofacteur de MyD88 pour l'activation de NF- κ B et AP1 en réponse à l'activation de TLR2 et TLR4. Il n'est par contre pas nécessaire dans les voies de signalisation activées par les autres TLRs (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Des études récentes ont montré que c'est l'adaptateur TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN α), parfois aussi appelé TICAM-1 (TIR domain-containing adaptor molecule-1) (Oshiumi et al., 2003), qui est responsable de la voie de signalisation MyD88-indépendante en aval de TLR4 et TLR3 (Hoebe et al., 2003a; Yamamoto et al., 2003a). De façon intéressante, les souris déficientes pour *MyD88* répondent normalement au dsRNA (Hoebe et al., 2003a), suggérant que TLR3 fonctionne de façon totalement MyD88-indépendante. Il apparaît également que des souris *trif*^{-/-} ou *tlr3*^{-/-} répondent encore au dsRNA, impliquant l'existence d'une voie de signalisation TLR3-indépendante, TRIF-indépendante en réponse au dsRNA (Hoebe et al., 2003b).

Enfin, un quatrième adaptateur, TRAM (TRIF-related adaptor molecule), aussi appelé TIRP (TIR domain containing protein) (Bin et al., 2003), a été impliqué dans la voie de signalisation MyD88-indépendante en aval de TLR4 (Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2003b). Les souris déficientes pour *tram* montrent des défauts de production des cytokines et des molécules co-stimulatrices induites de façon MyD88-indépendante en réponse au LPS, mais pas en réponse au dsRNA, qui active TLR3. De plus, la production MyD88-indépendante d'IFN- α induite par le LPS, est abolie dans des cellules déficientes pour *tram*. Ainsi, TRAM agit comme un co-facteur de TRIF dans la réponse MyD88-indépendante en aval de TLR4 (Yamamoto et al., 2003b) (Figure 5).

Ainsi, la signalisation initiée par les TLRs apparaît beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait au départ et pourrait se compliquer encore plus, étant donné l'existence d'un cinquième adaptateur à domaine TIR, SARM (Sterile α and HEAT-Armadillo Motifs) (O'Neill et al., 2003) (voir discussion).

II.3 Rôle des TLRs dans l'immunité adaptative

Les TLRs jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative : en effet, la reconnaissance de motifs microbiens par ces récepteurs conduit à l'activation des cellules dendritiques (revu dans (Reis e Sousa, 2004)).

Les cellules dendritiques jouent un rôle critique dans la réponse antimicrobienne chez les mammifères. En effet, ce sont des cellules présentatrices d'antigène qui peuvent activer les cellules T naïves. Leur maturation résulte de leur induction par des cytokines ou par l'activation des TLRs présents à leur surface. Cette maturation est caractérisée par la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF α et l'expression des molécules co-stimulatrices CD40, CD80 et CD86. Selon le type d'infection, les cellules dendritiques vont polariser les lymphocytes T vers une réponse de type Th1 (Lymphocytes T «*helper*»-1) ou Th2. Les TLRs jouent un rôle dans cette polarisation : en effet, l'activation de TLR4 ou TLR9 par le LPS ou l'ADN CpG, respectivement, conduit à l'activation des lymphocytes Th1 par l'intermédiaire de la cytokine IL-12 (Akira et al., 2001). De plus, des études sur les souris déficientes pour *MyD88* montrent que ces individus présentent un défaut d'activation de la

réponse Th1, tandis que la réponse Th2 est normale (Schnare et al., 2001). Toutefois, une autre étude menée dans un modèle murin de sensibilisation à un antigène inhalé montre que le type de réponse dépend de la dose de LPS inhalée : une faible dose mène à une réponse Th2, tandis qu'une forte dose mène à une réponse Th1. Dans les deux cas, cette réponse nécessite TLR4 (Eisenbarth et al., 2002). Une étude récente montre d'autre part que le lipopeptide triacylé synthétique Pam3Cys, un ligand de TLR2, induit une réponse de type Th2 quand on l'utilise comme adjuvant. Des résultats similaires ont été obtenus après immunisation avec le PGN, un autre ligand de TLR2. Dans la même étude, une immunisation avec un ligand de TLR9 induit une réponse Th1, indiquant que selon le type de stimulation, les TLRs peuvent orienter les réponses adaptatives vers une réponse Th1 ou Th2 (Redecke et al., 2004).

Ainsi, comprendre comment les TLRs régulent l'immunité adaptative pourrait aider au traitement des maladies infectieuses, des allergies et de certaines maladies autoimmunes.

III Le génome de la drosophile code une famille de récepteurs Toll

L'analyse du génome de la drosophile a permis l'identification d'une famille de neuf récepteurs Toll (Tauszig et al., 2000). La taille de cette famille est comparable à celle de la famille des TLRs (Figure 4). Cependant, il existe des différences frappantes entre les récepteurs Toll à Toll-8 et les TLRs de mammifère, au niveau intra- et extracytoplasmique. En effet, les Tolls possèdent au moins un motif riche en cystéine bordant l'extrémité N-terminale des LRRs (motifs NF), tandis que les TLRs n'en ont pas. De plus, les Tolls de drosophile possèdent souvent une extension carboxy-terminale qu'on ne retrouve jamais chez les TLRs (Figure 4). Enfin, une étude détaillée de la séquence des domaines TIR révèle des différences entre les Tolls de drosophile et des TLRs de mammifères.

Au début de ma thèse, en 2000, les récepteurs Toll étaient des candidats prometteurs pour porter une fonction immunitaire, notamment dans la voie IMD dont le récepteur restait encore à découvrir. De plus, le deuxième membre de la famille, appelé 18 wheeler (18w), semblait être impliqué dans la réponse antibactérienne et contrôler l'expression de peptides antibactériens comme l'Attacine (Williams et al., 1997).

Toll, qui fut d'abord identifié pour son rôle dans le développement de l'axe dorso-ventral de l'embryon (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984), est à ce jour le seul membre de la famille à avoir été impliqué dans la réponse immunitaire de la drosophile. La surexpression de versions constitutivement actives des récepteurs Toll à Toll-8 montre que seuls Toll et Toll-5 peuvent activer le promoteur de la *drosomycine* dans les cellules S2, et qu'aucun n'active le promoteur du peptide antibactérien *attacine* (Tauszig et al., 2000). De plus, des mouches mutantes pour 18w ou Toll-8 montrent une survie aux infections comparable à celle d'individus sauvages ((Ligoxygakis et al., 2002a) et Maria Capovilla, communication personnelle). Il semblerait donc que ces deux membres de la famille ne soient pas impliqués dans l'immunité, à l'inverse des TLRs de mammifères.

L'étude menée dans le laboratoire par Maria Capovilla montre que les récepteurs Toll de drosophile sont exprimés dans des sites morphogénétiques importants au cours du développement embryonnaire (Kambris et al., 2002). Les expériences d'hybridation *in situ* ont notamment montré que Toll-5 est exprimé dans les mêmes tissus que Toll, exception faite de l'épiderme. Ceci pourrait être une indication que Toll-5 est un co-récepteur de Toll, tout du moins pour certaines fonctions. Bien qu'il n'y ait pas, à l'inverse de ce qui est le cas pour Toll, de contribution maternelle pour Toll-5 et que son activité ne soit pas nécessaire pour la réponse à Spätzle dans les cellules S2, il serait intéressant d'étudier l'implication de Toll-5 dans certaines des fonctions zygotiques de Toll décrites plus bas. Toll-8 et 18w sont exprimés de façon assez similaire, sous forme de bandes circulaires, comme c'est le cas pour d'autres gènes impliqués dans le développement embryonnaire, comme *even-skipped*. Toll-6 et Toll-7 sont quant à eux exprimés dans le système nerveux. Enfin, Toll-4 est exprimé au niveau du compartiment hématopoïétique, suggérant qu'il pourrait peut-être jouer un rôle dans l'hématopoïèse, comme cela a été proposé pour Toll (Qiu et al., 1998).

Ces données suggèrent fortement que les récepteurs Toll-5, Toll-6, Toll-7 et Toll-8 sont impliqués dans le développement de la drosophile, comme c'est le cas pour Toll et 18w. En effet, ces deux récepteurs sont exprimés dans des régions de l'embryon qui s'invaginent au cours du développement (Chiang and Beachy, 1994; Eldon et al., 1994; Gerttula et al., 1988). Enfin, l'équipe de JM Reichhart a montré que 18w est nécessaire au bon développement du corps gras larvaire (Ligoxygakis et al., 2002a).

D'autres études ont révélé une fonction zygotique de Toll dans le développement des muscles et l'innervation. Dans les mutants Toll, on observe une réduction du nombre de motoneurones, ainsi que l'apparition de bourgeons axonaux ectopiques, indiquant un rôle de Toll dans la synaptogénèse de motoneurones spécifiques (Halfon et al., 1995; Rose et al., 1997). Une étude a également impliqué Toll-8/Tollo dans la glycosylation des neurones dans l'embryon (Seppo et al., 2003).

Une question qui reste ouverte est celle de l'identité des ligands des récepteurs Toll-2 à -8. Toll est activé par la liaison d'un ligand endogène, Spätzle (Weber et al., 2003), ce qui le différencie des TLRs qui, eux, sont activés

directement par un PAMP. Il est intéressant de noter que parmi les protéines possédant des motifs NF, on trouve les récepteurs Trk de neurotrophines. Les neurotrophines font partie de la famille des facteurs de croissance à noeud de cystéine, tout comme Spätzle. Une hypothèse séduisante pourrait être que les récepteurs Toll-2 à -8 fonctionnent comme des récepteurs de molécules apparentées à Spätzle: il existe en effet chez la drosophile une famille de cinq protéines homologues de Spätzle, Spz-2 à -6 (Parker et al., 2001).

Enfin, il existe chez la drosophile d'autres protéines à LRR possédant un motif NF, comme par exemple les molécules d'adhésion Tartan et Capricious, impliquées dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale lors du développement de l'aile. On pourrait de ce fait imaginer que les Tolls jouent aussi le rôle de molécules d'adhésion, comme cela a d'ailleurs été suggéré pour Toll et 18W. En effet, la surexpression de ces deux récepteurs dans les cellules S2 résulte en la formation d'aggrégats cellulaires (Eldon et al., 1994; Keith and Gay, 1990).

PRESENTATION DU TRAVAIL DE **THESE**

La découverte du rôle clé du récepteur Toll dans l'immunité de la drosophile a provoqué, en l'espace de huit ans, l'accumulation d'un savoir extraordinaire sur les mécanismes qui gouvernent la réponse immunitaire innée des mammifères, ainsi que sur la façon dont elle médie la réponse adaptative, même s'il reste encore nombre de découvertes à faire avant de parvenir à la pleine compréhension de ses mécanismes.

En 2000, au moment où j'ai débuté ma thèse, un certain nombre d'indices concordants indiquaient que les TLRs jouaient un rôle critique dans la détection du non-soi infectieux, qu'il s'agisse de bactéries à Gram-positif ou négatif, de champignons ou de virus. L'hypothèse que nous avons formulée à ce moment-là était que la famille de récepteurs Toll chez la drosophile pouvait remplir le même rôle. En particulier, nous pensions que le récepteur de la voie IMD pouvait être un membre de la famille Toll. Nous ne disposions pas de mutants pour ces différents récepteurs et avons donc décidé de caractériser l'homologue de MyD88, un adaptateur impliqué dans la voie de signalisation en aval de tous les TLRs (à l'exception de TLR3). Je décris dans ce manuscrit le rôle de DmMyD88 dans la réponse immunitaire de la drosophile, ainsi que son implication dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon. Enfin, je décris le récepteur Toll-9, qui interagit avec DmMyD88 et ressemble fortement aux TLRs de mammifères.

RESULTATS

I. DmMyD88, un nouveau composant de la voie Toll impliqué dans la réponse aux bactéries à Gram-positif et aux champignons.

I DmMyD88, un nouveau composant de la voie Toll impliqué dans la réponse aux bactéries à Gram-positif et aux champignons.

Nous avons identifié et caractérisé un nouveau composant de la voie Toll, qui est nécessaire pour la réponse contre les infections par des bactéries à Gram-positif et par des champignons entomopathogènes.

Durant l'analyse du génome de la drosophile, l'homologue de *MyD88*, *DmMyD88*, a été identifié. La protéine *DmMyD88* est constituée d'un domaine de mort ou Death Domain amino-terminal (DD), suivi d'un domaine TIR carboxy-terminal. La protéine de drosophile possède en outre une extension carboxy-terminale (CTE) qu'on ne retrouve pas dans la protéine de mammifère.

Nous avons montré que dans les cellules S2, *DmMyD88* est capable d'activer le promoteur du peptide antifongique *drosomycine*, mais pas celui d'un peptide antibactérien, l'Attacine. De la même façon, l'inactivation de *DmMyD88* par la technique d'interférence à l'ARN, ou RNAi, affecte spécifiquement l'activation Toll-dépendante du promoteur *drosomycine*, et non celle du promoteur de l'*attacine*, médiée par un extrait de la bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli*. Ces résultats suggèrent une implication de *DmMyD88* dans la voie Toll, et non dans la voie IMD. Nous avons construit des versions tronquées de *DmMyD88* et montré que son domaine TIR active le promoteur de la *drosomycine*, à l'inverse du DD.

Nous avons montré une interaction entre *DmMyD88* et Toll^{DLRR} dans les cellules S2 transfectées avec des constructions flanquées respectivement des étiquettes peptidiques V5 et FLAG. C'est le domaine TIR de *DmMyD88* qui est nécessaire pour l'interaction entre les deux protéines. Par contre, nous n'avons pas détecté d'interaction entre *DmMyD88* et les récepteurs 18W, Toll-5, Toll-6, Toll-7 ou Toll-8. Enfin, ces expériences d'immunoprécipitation nous ont permis de montrer une interaction entre *DmMyD88* et la kinase Pelle.

Nous avons construit des lignées transgéniques portant soit la version complète de *DmMyD88*, soit uniquement le Death Domain en aval des séquences régulatrices UAS. L'ADNc de *DmMyD88* ou de *DmMyD88*-DD est introduit sous contrôle d'un multimère du motif UAS_{Gal4} de levure. On croise alors ces mouches avec une souche «pilote» exprimant le gène *Gal4* de levure sous le contrôle du

promoteur du gène *yolk*. *Yolk* étant une protéine majeure du vitellus, la protéine Gal4 n'est alors exprimée que dans les cellules du corps gras des femelles. Grâce à ce système, nous avons confirmé les données des cellules et montré que la surexpression de *DmMyD88* est suffisante pour activer l'expression de la *drosomycine*. Nous avons en outre pu montrer que *DmMyD88* agit en amont de *tube* et *pelle* dans la voie Toll.

Enfin, nous avons analysé une lignée de drosophile, EP(2)2133, qui comporte un élément transposable dans la région 5' non codante du gène *DmMyD88*. Dans ces mouches, l'expression de *drosomycine* après une infection bactérienne ou fongique est fortement réduite, alors que l'expression du peptide antibactérien Diptéricine est comparable à celle de mouches sauvages. De plus, les mouches mutantes pour *DmMyD88* montrent un taux de survie considérablement réduit après des infections par une bactérie à Gram-positif, *Streptococcus faecalis*, ou par un champignon entomopathogène, *Beauveria bassiana*. Par contre, elles résistent tout à fait normalement aux infections par des bactéries à Gram-négatif telles qu'*Escherichia coli*. Ce phénotype est identique à celui de mutants pour des composants de la voie Toll. Pour montrer que le phénotype observé est bien dû à l'insertion du transposon dans le gène *DmMyD88* et non à une mutation dans un autre locus, nous avons utilisé des déficiences, parmi lesquelles Df4966 et Df5423. La déficience Df4966 découvre le locus *DmMyD88*, à l'inverse de la déficience Df5423. L'analyse du phénotype d'individus trans-hétérozygotes pour l'élément P et l'une de ces déficiences montre une complémentation uniquement dans le cas de la déficience Df5423. Nous avons également excisé de façon précise l'élément P et montré que cela permet une réversion du phénotype, montrant sans ambiguïté que le phénotype observé est bien dû à l'insertion du transposon dans le gène *DmMyD88*.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article I ci-après.

**ARTICLE I: *Drosophila* MyD88 is
required for the response to fungal and
Gram-positive bacterial infections**

S. Tauszig-Delamasure, H. Bilak, M. Capovilla, J.A. Hoffmann
and J.L. Imler, Nature Immunology 3, 91-97 (2002)

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

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

Servane Tauszig-Delamasure, **Hana Bilak**, Maria Capovilla, Jules A. Hoffmann & Jean-Luc Imler

Nature Immunology, 2002, vol. 3, n°1, pages 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

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

Dans cet article, nous avons montré que le domaine TIR de DmMyD88 active le promoteur de la *drosomyeine*, ce qui n'est pas le cas de son DD. Nous avons alors voulu savoir si le DD de DmMyD88 avait un effet dominant-négatif sur l'activation du promoteur. Le promoteur de la *drosomyeine* est induit plus de dix fois par la transfection d'un vecteur exprimant SpzC106, c'est-à-dire les 106 acides aminés C-terminaux qui représentent la partie active du ligand de Toll (Weber et al., 2003). Lorsqu'on co-transfecte des vecteurs exprimant SpzC106 et une version dominant-négative de Pelle dans laquelle le domaine kinase a été délété (Pelle DN), cette activation est largement réduite, pour retomber à des valeurs équivalentes à celles obtenues en l'absence de SpzC106. Lorsqu'on transfecte le DD de DmMyD88, on obtient la même réduction qu'avec Pelle DN, indiquant que le DD de DmMyD88 a un effet dominant-négatif sur la voie Toll (Figure 6).

Le fait que DmMyD88 ne soit pas impliqué dans la voie IMD met en lumière des différences entre la réponse aux bactéries à Gram-négatif chez la drosophile et les mammifères. De plus, cela va à l'encontre de notre hypothèse selon laquelle le récepteur de la voie IMD pourrait être un membre de la famille Toll, laissant ouverte la question du rôle des huit autres récepteurs Toll. Enfin, la spécificité de l'interaction DmMyD88-Toll suggère que les autres Tolls de drosophile fonctionnent de façon DmMyD88-indépendante, à l'inverse des TLRs de mammifères.

Ainsi, nous avons caractérisé un nouvel élément impliqué dans la voie Toll au cours de la réponse immunitaire adulte, mais curieusement, nous n'avons observé aucun phénotype embryonnaire de la lignée EP(2)2133, à l'inverse de ce qui est le cas pour la majorité des mutants de la voie Toll. Soit DmMyD88 n'est effectivement pas impliqué dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de la drosophile, soit l'allèle *DmMyD88*^{EP(2)2133} est un allèle hypomorphe. C'est en effet une des limitations de notre article, puisque nous n'avons qu'un seul allèle mutant à étudier.

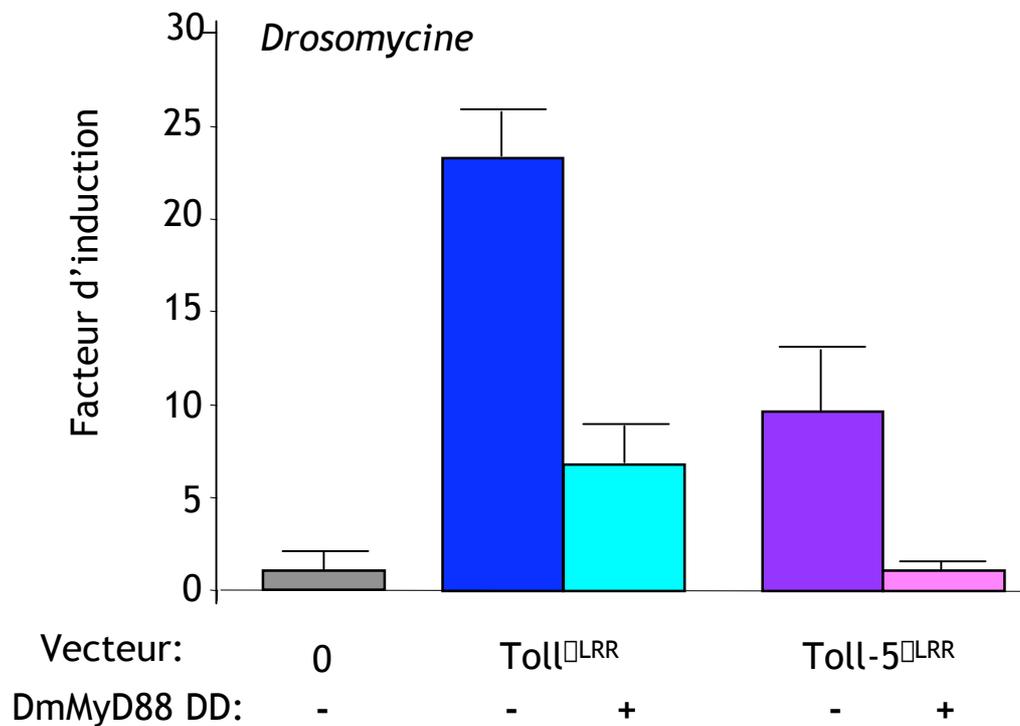


Figure 6: Le Death Domain de DmMyD88 a un effet dominant-négatif sur l'activation du promoteur de la *drosomycine* par Toll^{ΔLRR} et Toll-5^{ΔLRR}. Les cellules S2 sont co-transfectées avec un vecteur d'expression vide (0) ou exprimant Toll^{ΔLRR} ou Toll-5^{ΔLRR} ainsi qu'avec un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la *drosomycine*. Elles sont également co-transfectées (+) ou non (-) avec un plasmide exprimant le Death Domain (DD) de DmMyD88. Le facteur d'induction est calculé par rapport à la mesure de l'activité luciférase obtenue après transfection du vecteur vide. Les transfections sont réalisées en triplicats et le graphe montre la moyenne et l'écart-type des résultats.

II. DmMyD88 est nécessaire pour la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon.

II DmMyD88 est nécessaire pour la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon.

Après la publication de cet article, nous avons reçu de la compagnie Exelixis à San Francisco la lignée PBc03881, qui contient un élément transposable *piggybac* inséré dans le dernier intron de *DmMyD88* (Thibault et al., 2004). Nous avons remarqué que les femelles de cette lignée sont stériles et nous avons alors cherché un rôle de *DmMyD88* dans le développement embryonnaire.

Nous avons montré d'une part que le transcrit *DmMyD88* est présent dans des embryons âgés de 0 à 2 heures, révélant une contribution maternelle pour ce gène, puisqu'à ce stade de développement, la machinerie cellulaire de transcription propre de l'embryon n'est pas encore fonctionnelle. Cette contribution maternelle est observée pour tous les gènes de la voie Toll dans l'embryon.

Dans la lignée PBc03881, le transcrit *DmMyD88* est détectable par la technique du Northern Blot, mais des expériences de RT-PCR ont montré qu'il s'agit en fait d'un ARN chimérique, dans lequel le dernier exon de *DmMyD88* est remplacé par les exons II, III et IV du gène *white*. Ceci résulte en la formation d'une protéine stable, mais dans laquelle l'extension carboxy-terminale de *DmMyD88* est absente, remplacée par 39 amino-acides hétérologues. Lorsqu'on transfecte dans les cellules S2 une version tronquée de *DmMyD88*, déletée de son domaine CTE, on n'observe plus d'activation du promoteur de la *drosomycine*, indiquant l'importance de cette extension pour la fonction de la protéine.

Nous avons alors étudié le phénotype immunitaire de la lignée PBc03881. Nous avons montré qu'il est identique à celui de la lignée EP(2)2133 et qu'il peut être sauvé par l'expression d'un ADNc de *DmMyD88* par le système UAS-GAL4.

Nous avons analysé les cuticules des embryons pondus par les femelles PBc03881 et observé qu'ils sont dorsalisés, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas de structures caractéristiques d'un destin cellulaire ventral. De plus, dans les cellules ventrales de ces embryons, nous n'avons pu détecter la localisation nucléaire de *Dorsal*, ni l'expression de l'un de ses gènes cibles, *twist*. Ce phénotype développemental peut être sauvé par l'excision du *piggybac*, ce qui confirme que

le phénotype observé est bien dû à une mutation dans *DmMyD88*. Par des expériences d'épistasie avec un allèle dominant de *Toll*, *Toll^{10B}*, nous avons montré que *DmMyD88* intervient en aval de *Toll* lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral chez l'embryon.

Ces résultats font l'objet de l'article II ci-après.

ARTICLE II □ DmMyD88 controls dorso-ventral patterning of the *Drosophila* embryo

Z. Kambris*, H. Bilak*, R. D'Alessandro, M. Belvin, J.L. Imler and M. Capovilla, *EMBO Reports* 4, 64-69 (2003).

* Contribution équivalente

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

DmMyD88 controls dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo

Zakaria Kambris, **Hana Bilak**, Rosalba D'Alessandro, Marcia Belvin, Jean-Luc Imler & Maria Capovilla

EMBO Reports, Janvier 2003, vol. 4, n°1, pages 64–69

Pages 64–69 :

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=/embor/journal/v4/n1/full/embor714.html>

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

En conclusion, le nouveau composant de la voie Toll que nous avons identifié est non seulement impliqué dans la réponse immunitaire de la drosophile, mais également dans le développement embryonnaire, ce qui signifie que les composants intracytoplasmiques de cette voie sont pour l'essentiel identiques chez l'embryon et l'adulte. De plus, nous avons montré l'importance de l'extension carboxy-terminale de la protéine DmMyD88, qui n'existe pas chez les mammifères. L'importance de l'extension carboxy-terminale de DmMyD88 et le caractère dominant-négatif lié à son Death Domain indiquent que ce facteur fonctionne différemment de son homologue de mammifère.

III. DmMyD88 interagit aussi avec Toll-9.

III DmMyD88 interagit aussi avec Toll-9

III.1 Toll-9 est un homologue structural et fonctionnel des TLRs de mammifères

Nous nous sommes ensuite tournés vers l'étude de Toll-9, un membre de la famille des récepteurs Toll qui présente des caractéristiques structurales particulièrement intéressantes.

III.1.1 Le domaine TIR de Toll-9 est phylogénétiquement plus proche de celui des TLRs que de celui des autres Tolls de drosophile.

Le domaine intracytoplasmique de Toll-9, son domaine TIR, présente un taux d'identité plus faible avec les domaines TIR des autres Tolls que celui observé lorsqu'on aligne les autres membres de la famille entre eux. Si l'on regarde l'arbre phylogénétique obtenu en comparant les molécules à domaine TIR de l'Homme, de la souris, de *Drosophila melanogaster*, d'*Anopheles gambiae* et de la plante *Arabidopsis thaliana*, on distingue plusieurs branches (Figure 7, d'après (Imler and Zheng, 2004)). La famille des récepteurs de l'Interleukine-1 (IL-1R) forme un sous-groupe distinct, comme celle des molécules cytosoliques à domaine TIR qui regroupe les protéines d'*A.thaliana* et les adaptateurs MyD88. Les Tolls de drosophile et d'anophèle forment une sous-famille distincte de celle des TLRs de mammifères. De façon intéressante, on retrouve dans le groupe des TLRs les récepteurs Toll-9 de *D.melanogaster* et d'*A.gambiae*, illustrant le fait que le domaine TIR de Toll-9 ressemble plus à celui des TLRs qu'à celui des autres Tolls de drosophile.

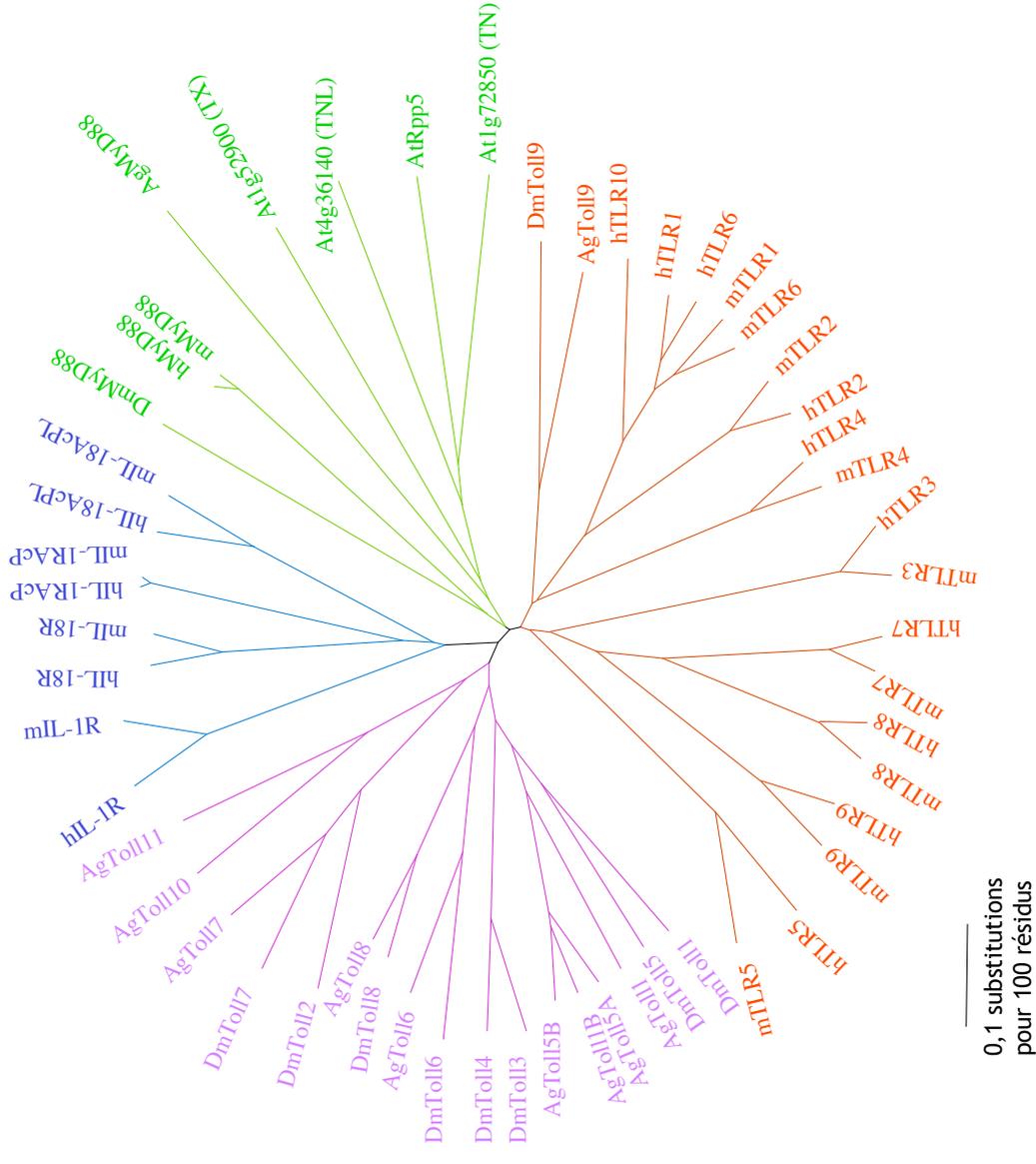


Figure 7: Toll-9 est phylogénétiquement plus proche des TLRs que des Tolls (Imler and Zheng, 2004). Etude phylogénétique des protéines à domaine TIR de l'Homme (h), la souris (m), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Anopheles gambiae* (Ag) et *Arabidopsis thaliana* (At). Les molécules cytosoliques à domaine TIR sont représentées en vert, une partie de la famille des récepteurs de l'Interleukine-1 (IL-1R) est représentée en bleu, les Tolls de drosophile et d'anophèle en violet et les TLRs murins et humains. Les récepteurs Toll-9 de *D.melanogaster* et *A.gambiae* sont représentés en orange.

III.1.2 Le domaine extracytoplasmique de Toll-9 contient un seul motif C-flank, comme celui des TLRs.

Toll-9 possède, comme les autres Tolls, un domaine extracellulaire composé de répétitions riches en leucine (LRRs pour Leucine-rich repeats). Ces LRRs sont bordés du côté carboxy-terminal par des motifs riches en cystéine, C-flank ou CF. Ces motifs C-terminaux sont extrêmement conservés; tous les Tolls de drosophile et les TLRs de mammifères contiennent un LRR C-terminal qui commence par une séquence consensus LRR aux positions 1-12 et qui continue par environ 50 résidus contenant 4 cystéines espacées de façon caractéristique, xLxxLxLxxNxFxCxCx(24-26)Cx(18-21)C. Nous présentons dans la figure 8 l'alignement du motif CF de Toll-9 avec celui de la séquence consensus; on retrouve bien les 4 résidus cystéines caractéristiques. La mutation d'une de ces cystéines en tyrosine est caractéristique d'un allèle gain-de-fonction de Toll. Tony Ip et coll. ont proposé que Toll-9 contenait une telle substitution, ce qui les a conduit à considérer Toll-9 comme un récepteur constitutivement actif (Ooi et al., 2002). Toutefois, l'alignement en question ne nous paraît pas juste, puisqu'on n'y retrouve pas certains des résidus conservés dans la séquence LRR et que la quatrième cystéine se trouve dans ce que nous considérons être le domaine transmembranaire du récepteur (Figure 8).

A l'inverse des huit autres Tolls de drosophile, Toll-9 ne possède pas de motif riche en cystéine du côté amino-terminal (NF pour N-flank), ce qui le rapproche des TLRs de mammifères, qui eux aussi ne possèdent qu'un CF proche de la membrane.

En conclusion, Toll-9 apparaît comme une molécule particulièrement intéressante et nous avons cherché à savoir si elle possède des fonctions similaires à celle des TLRs et si elle a un lien avec l'immunité de la drosophile.

III.1.3 Toll-9 peut réguler l'expression de la *drosomycine* dans les cellules S2.

Comme nous ne connaissions pas le ligand de Toll-9, nous avons construit une version constitutivement active du récepteur, Toll-9^{LRR}, obtenue en délétant les LRRs extracellulaires. Lorsqu'on co-transfecte cette construction dans les

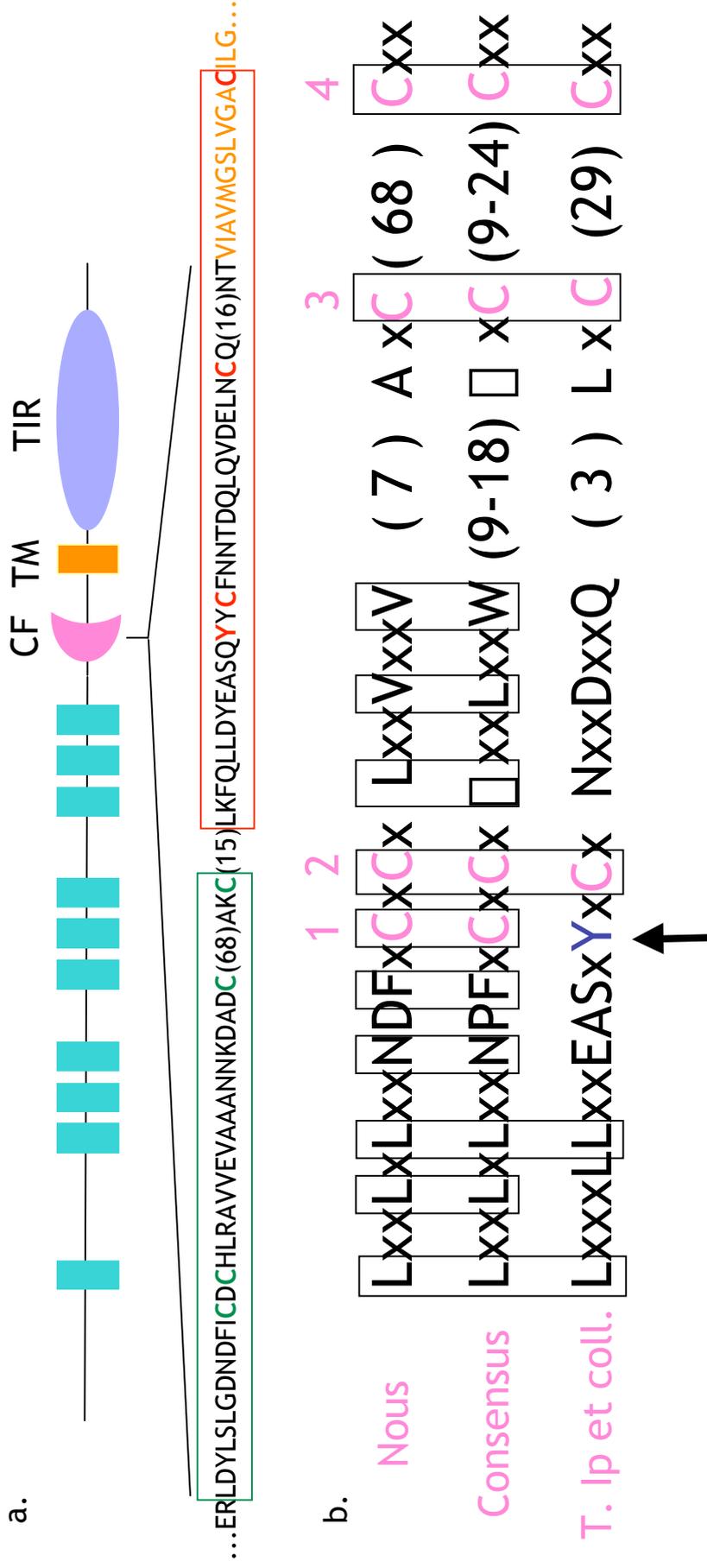


Figure 8: Alignement de la séquence du motif C-flank de Toll-9 à la séquence consensus. a. La séquence de Toll-9 ayant permis notre alignement est encadrée en vert dans la séquence présentée ci-dessus, tandis que celle ayant servi à celui de T. Ip est encadrée en rouge. Les cystéines ainsi que la tyrosine sont surlignées. Les résidus du domaine transmembranaire (TM) sont en orange. Dans l'alignement de Tony Ip, la quatrième cystéine se trouve dans le domaine TM. b. Les cystéines (C) conservées sont indiquées en rose. La flèche indique la tyrosine (Y) équivalente à la mutation Tl^{10b} dans l'alignement proposé par Tony Ip et coll. □ : acide aminé hydrophobe. x indique n'importe quel acide aminé. TIR: domaine TIR. CF: C-flank.

cellules S2 avec un plasmide rapporteur *drosomyeine-luciférase*, on observe que Toll-9^{ΔLRR} active le promoteur de la *drosomyeine* de façon comparable à une version constitutivement active de Toll (Figure 9a). Par contre, on n'observe pas d'activation du promoteur de l'*attacine*, contrairement à ce que l'on observe lorsqu'on transfecte un plasmide exprimant IMD (Figure 9b). Afin de déterminer si Toll-9 utilise la même voie de signalisation que Toll pour activer la transcription de la *drosomyeine*, nous avons étudié l'effet de versions dominant-négatives de DmMyD88 (DmMyD88 DD), Tube (Tube DD) et Pelle (Pelle délété de son domaine kinase, PelleDN) sur cette activation. Lorsque ces trois constructions sont co-transfectées avec Toll-9^{ΔLRR} et le plasmide exprimant le gène rapporteur *luciférase* sous le contrôle du promoteur de la *drosomyeine*, on observe une nette diminution de l'induction de la *drosomyeine*. Ceci suggère que Toll-9 utilise le même complexe adaptateur que Toll (Figure 10). Nous avons également montré par des expériences d'interférence à l'ARN double-brin que l'activation du promoteur *drosomyeine* par Toll-9 est dépendante de DmMyD88 (données non montrées et voir plus loin).

III.1.4 Toll-9 induit spécifiquement l'expression de *drosomyeine* *in vivo*.

Nous avons montré *in vivo* qu'une construction UASToll-9^{ΔLRR}, surexprimée grâce au pilote *yolk-GAL4* spécifique du corps gras des femelles, active de façon constitutive la transcription du gène de la *drosomyeine*, ce à un niveau comparable à celui observé après une infection par un mélange de bactéries à Gram-positif et négatif (Figure 11a, comparer la ligne 2 à la ligne 4). On observe également une induction de l'expression du transcrit de l'autre peptide à activité antifongique, la Metchnikovine. L'*attacine* est aussi faiblement induite, mais beaucoup moins qu'après une blessure septique. Nous avons également mené des expériences d'épistasie *in vivo*, en surexprimant Toll-9^{ΔLRR} grâce au pilote *yolk-GAL4* dans un contexte mutant pour *pelle*. On observe que l'activation constitutive de la *drosomyeine* due à la surexpression de Toll-9^{ΔLRR} est abolie dans un contexte *pelle* mutant (Figure 11b, comparer les lignes 1 à 3 et 4 à 6). Ces expériences *in vivo* confirment les résultats obtenus dans les cellules S2.

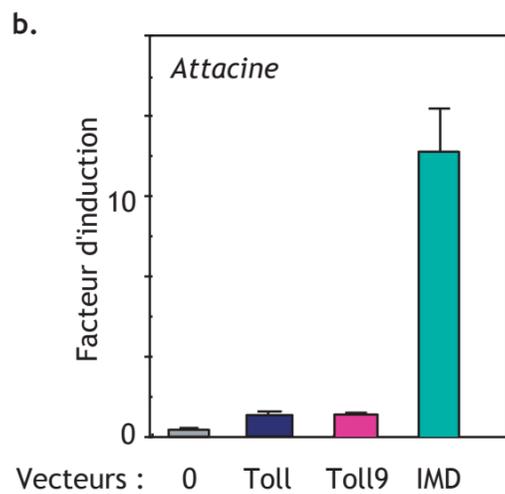
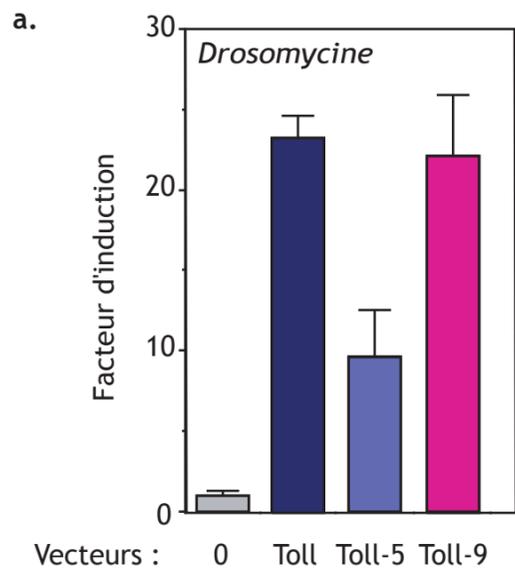


Figure 9: Toll-9 active le promoteur du peptide antifongique Drosomycine, mais pas celui du peptide antibactérien Attacine. a: La surexpression de Toll-9 Δ LRR active le promoteur de la *drosomycine*. Les cellules S2 sont transfectées avec un vecteur d'expression vide (0) ou exprimant Toll Δ LRR, Toll-5 Δ LRR ou Toll-9 Δ LRR et un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la *drosomycine*. Le facteur d'induction est calculé par rapport à la mesure de l'activité luciférase obtenue après transfection du vecteur vide. b: L'expression de Toll Δ LRR ou Toll-9 Δ LRR n'active pas le promoteur de l'*attacine* dans les cellules S2, contrairement à la surexpression d'IMD. Les cellules S2 sont co-transfectées avec le vecteur d'expression et avec un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle du promoteur de l'*attacine*. Le facteur d'induction est calculé par rapport à la mesure de l'activité luciférase obtenue après transfection du vecteur vide. Les transfections sont réalisées en triplicat et les graphes montrent la moyenne et l'écart-type des résultats.

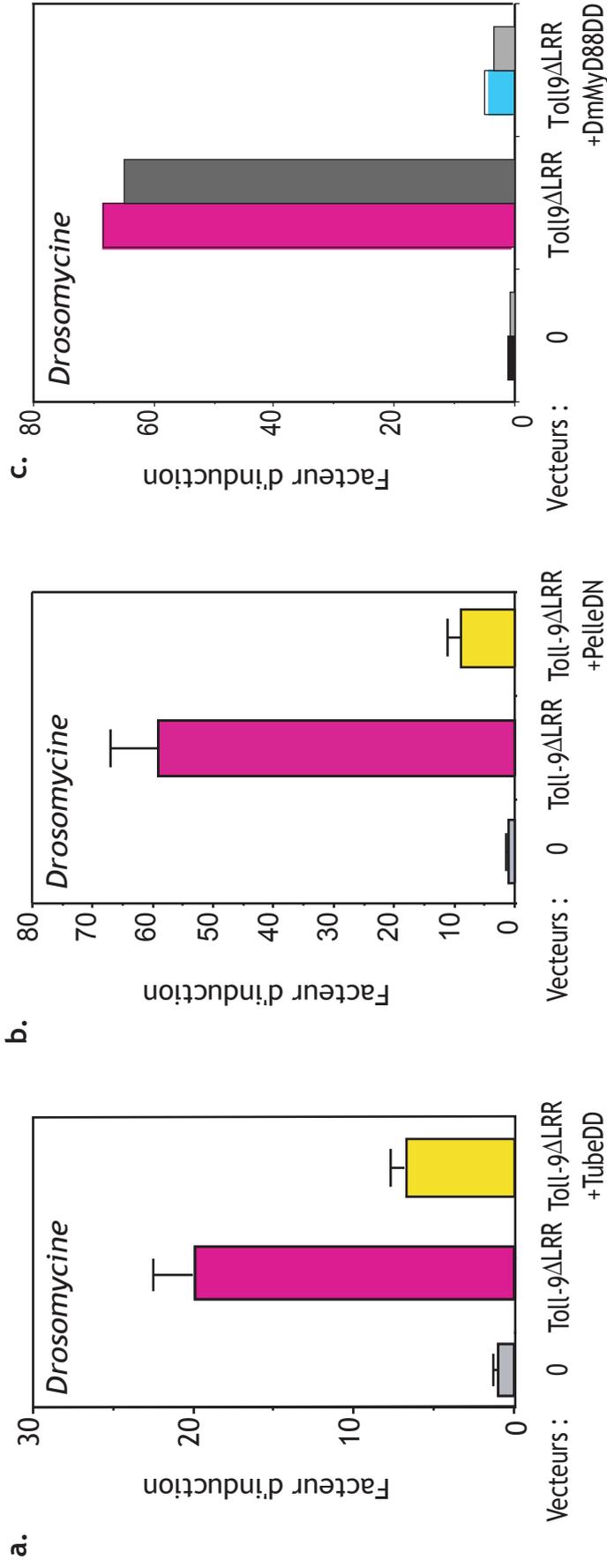


Figure 10: Toll-9 active le promoteur de la drosomycine via Tube, Pelle et DmMyD88. Les cellules S2 sont co-transfectées avec un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la *drosomycine* et avec **a**: un vecteur d'expression vide (0) ou exprimant *Toll9ΔLRR* ou la combinaison de *Toll9ΔLRR* et de la version dominant-négative de *Tube* correspondant à son Death Domain, *TubeDD*. **b**: un vecteur d'expression vide (0) ou exprimant *Toll9ΔLRR* ou la combinaison de *Toll9ΔLRR* et de la version dominant-négative de *Pelle* dont le domaine kinase a été muté, *PelleDN*. **c**: un vecteur d'expression vide (0), ou exprimant *Toll9ΔLRR* ou la combinaison de *Toll9ΔLRR* et de la version dominant-négative de *DmMyD88* correspondant à son Death Domain, *DmMyD88DD*. Le facteur d'induction est calculé par rapport à la mesure de l'activité luciférase obtenue après transfection du vecteur vide. Pour a et b, les expériences sont réalisées en triplicat et les graphes montrent la moyenne et l'écart-type des résultats. Pour c, les résultats montrés sont ceux de deux expériences indépendantes.

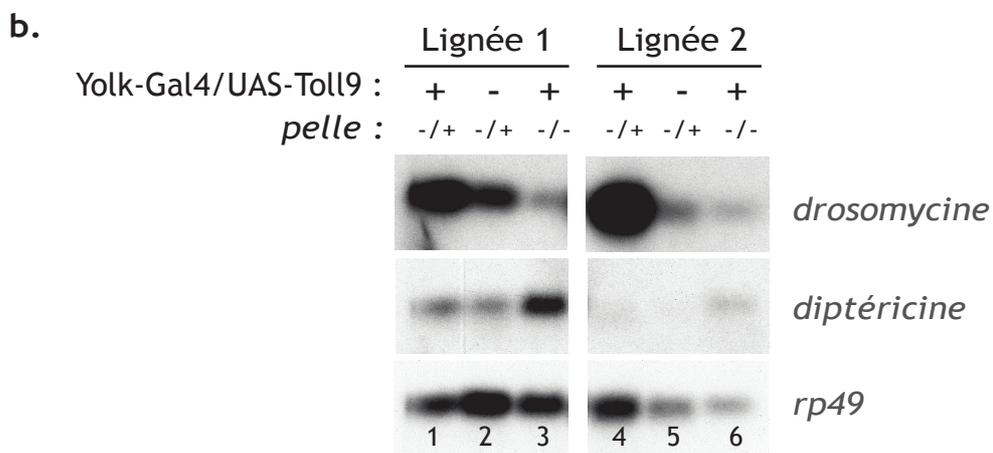
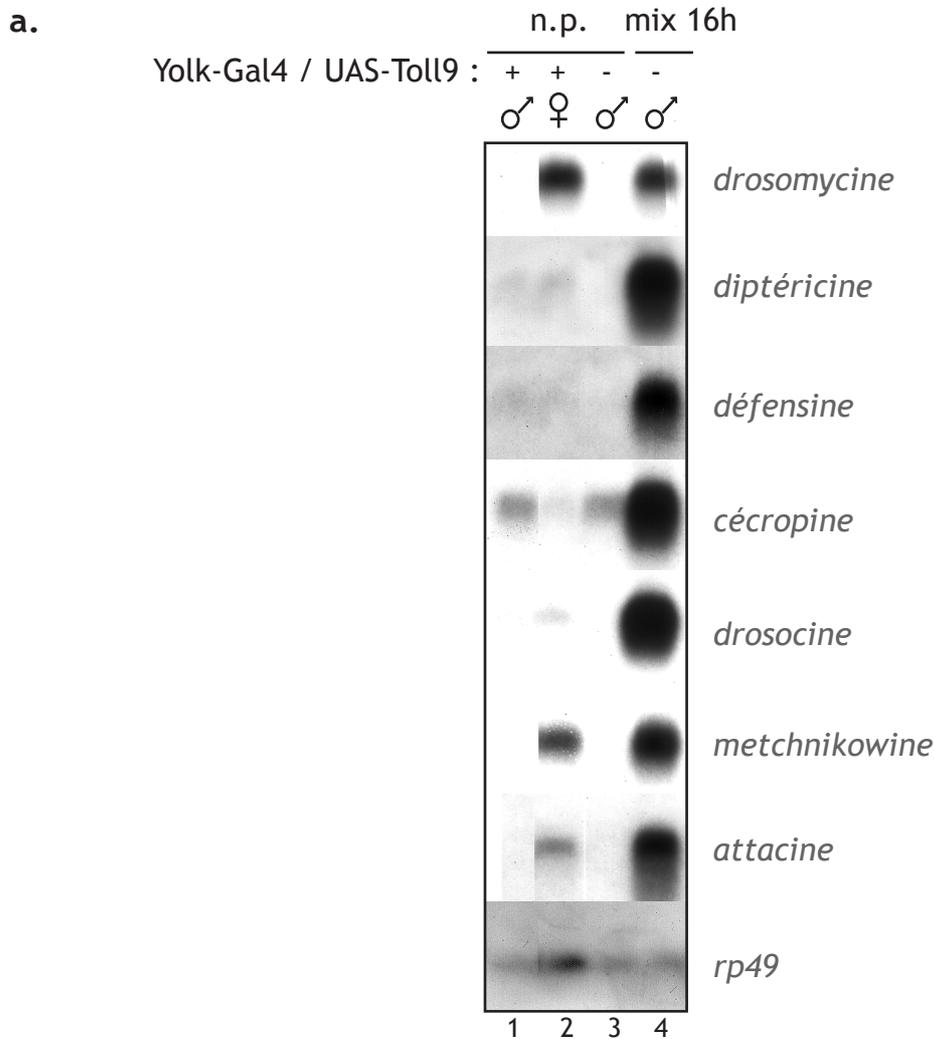


Figure 11: La surexpression de *Toll-9* *in vivo* induit l'expression constitutive de la *drosomycine* via *Pelle*. a: Les mouches portant le transgène *UAS-Toll9 Δ LRR* sont croisées à des mouches portant le pilote *ylk-Gal4*, qui est spécifiquement actif dans les cellules du corps gras des femelles. Les mâles servent ainsi de contrôle négatif dans cette expérience (+). Les mouches portant à la fois le transgène et le pilote sont collectées sans avoir été infectées (np), les mâles et les femelles sont séparés et leurs ARNs totaux sont extraits et analysés par Northern Blot. En contrôle positif, des mâles sauvages (-) ont été collectés 16h après avoir été piqués avec un mélange de bactéries à Gram-positif et négatif (mix16h: *M.luteus* + *E.coli*). b: L'expression constitutive de la *drosomycine* induite par la surexpression ectopique de Toll-9 est dépendante de Pelle. Deux lignées indépendantes ont été générées, portant le transgène *UAS-Toll9 Δ LRR* (+) ou non (-), le pilote *ylk-Gal4* et un allèle mutant de *pelle* de façon hétérozygote (-/+ : *pIl⁰⁷⁸/+* ou *pIl^{rm8}/+*) ou trans-hétérozygote (-/- : *pIl⁰⁷⁸/pIl^{rm8}*). Les ARNs totaux des femelles sont 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.

Enfin, nous avons fait des expériences d'immunoprécipitations pour tester une interaction possible entre Toll-9 et DmMyD88. Nous avons pour cela co-transfecté des cellules S2 avec le vecteur d'expression de DmMyD88 portant l'étiquette V5 (DmMyD88-V5) et des versions constitutivement actives de Toll, Toll-9, Toll-5, Toll-6 ou Toll-8 portant l'étiquette FLAG (Toll^{ΔLRR}-FLAG, Toll-9^{ΔLRR}-FLAG, Toll-5^{ΔLRR}-FLAG, Toll-6^{ΔLRR}-FLAG et Toll-8^{ΔLRR}-FLAG). L'immunoprécipitation est effectuée sur les extraits cellulaires avec des billes portant un anticorps monoclonal anti-FLAG et est suivie d'une analyse par Western Blot en utilisant un anticorps anti-V5 ou anti-FLAG. DmMyD88 co-immunoprécipite avec Toll et Toll-9, mais pas avec les autres membres de la famille Toll (Figure 12). On recueille avant l'immunoprécipitation une aliquote de l'extrait cellulaire que l'on analyse par Western Blot avec l'anticorps anti-V5 afin de vérifier les quantités de protéines déposées. Nous avons reproduit cette expérience plusieurs fois et avons toujours détecté plus de protéine DmMyD88 lorsqu'on co-transfecte Toll^{ΔLRR} ou Toll-9^{ΔLRR}, certainement parce que la formation du complexe entre le récepteur et l'adaptateur stabilise DmMyD88.

Le fait que Toll et Toll-9 activent le promoteur de la *drosomycine* en utilisant le même complexe membranaire d'adaptateurs, ce malgré les différences observées au niveau de leur domaine TIR, suggère qu'ils pourraient constituer les deux sous-unités d'un même récepteur.

III.2 Toll-9 est-il un corécepteur de Toll ou peut-il être activé de façon indépendante?

Pour tester cette hypothèse, nous avons construit des lignées stables de cellules S2 qui expriment une version sauvage de *Toll-9* sous le contrôle d'un promoteur métallothionine inductible par le cuivre, MT-Toll-9. Lorsqu'on transfecte le plasmide rapporteur *drosomycine-luciférase* dans ces cellules, on observe une forte activité constitutive du promoteur de la *drosomycine*, même sans induction par le cuivre. Par des expériences d'interférence à l'ARN double-brin, nous avons confirmé que cette activation est bien due à Toll-9. Nous avons utilisé les cellules MT-Toll-9 pour des expériences de RNAi avec Toll. L'activation constitutive du promoteur de la *drosomycine* dans les cellules MT-Toll-9 n'est réduite que lorsqu'on les co-transfecte avec de l'ARN double-brin correspondant à

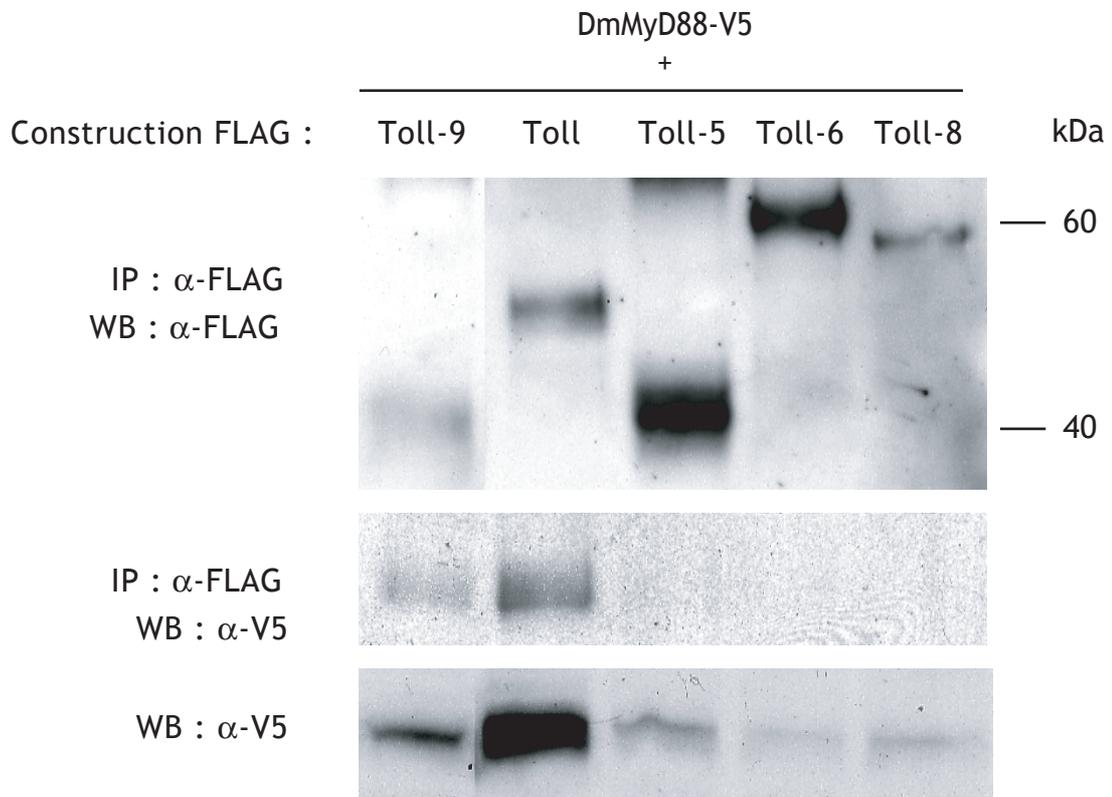


Figure 12: DmMyD88 interagit spécifiquement avec Toll et Toll-9. DmMyD88 co-immunoprécipite avec Toll et Toll-9, mais avec aucun autre membre de la famille dans les cellules S2. Les cellules sont transfectées avec un vecteur d'expression codant pour DmMyD88-V5 et soit le vecteur codant pour la version constitutivement active Toll Δ LRR-FLAG, soit les constructions chimériques composées de l'ectodomaine de Toll Δ LRR-FLAG fusionné au domaine intracytoplasmique de Toll-9, -5, -6 et -8. Les extraits cellulaires sont immunoprécipités (IP) avec un anticorps monoclonal anti-FLAG, et analysées par immunoblot avec un anticorps anti-V5 ou anti-FLAG (WB). Une aliquote de l'extrait cellulaire avant immunoprécipitation est analysée par immunoblot avec un anticorps anti-V5 (WB).

Toll-9, mais pas lorsqu'on co-transfecte de l'ARN double-brin correspondant à la GFP ou à Toll (Figure 13a). Ceci signifie que Toll-9 peut activer le promoteur de la *drosomycine* même en l'absence de Toll. De la même façon, l'activation Toll-dépendante du promoteur de la *drosomycine* par Spätzle est indépendante de Toll-9. En effet, dans des cellules S2 co-transfectées avec le rapporteur *drosomycine-luciférase* et activées par Spätzle, l'activation du promoteur de la *drosomycine* n'est réduite que lorsqu'on co-transfecte de l'ARN double-brin correspondant à Toll. La co-transfection de l'ARN double-brin correspondant à Toll-9 n'a aucun effet sur cette activation (Figure 13b). Ceci exclut le fait que Toll-9 soit un co-récepteur de Toll et montre qu'il peut être activé de façon indépendante par un ligand qui reste toujours élusif.

Ainsi, Toll et Toll-9, malgré leurs séquences éloignées, sont capables d'induire indépendamment l'un de l'autre une même cible transcriptionnelle en utilisant la même voie de transduction. Au vu des données obtenues, on peut considérer Toll-9 comme un homologue structural et fonctionnel des TLRs de mammifères. En effet, sa séquence le rend plus proche de ces récepteurs que des autres Tolls de drosophile et il active une cible NF- κ B-dépendante *via* les homologues de l'adaptateur MyD88 et de la kinase IRAK.

III.3 Etude du phénotype de deux lignées contenant des transposons dans le gène *Toll-9*.

La compagnie Exelixis nous a envoyé deux lignées de drosophile comportant des transposons insérés dans le gène *Toll-9*. La lignée PBc05666 comporte un *piggybac* inséré dans le cinquième intron du gène, et la lignée RBe01268 comporte un élément transposable de type *razorbac* en aval du codon stop, dans les séquences régulatrices du gène (Figure 14a). Par Northern Blot, on détecte un transcrit *Toll-9* dans la lignée PBc05666, mais de taille réduite par rapport au transcrit sauvage (Figure 14b). Pour confirmer ce résultat, nous avons effectué une 3'RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) pour cloner l'allèle *Toll-9*^{PBc05666}. Cette expérience nous a permis de déterminer que l'insertion du transposon dans la lignée PBc05666 conduit à l'expression d'un transcrit *Toll-9* tronqué au niveau du

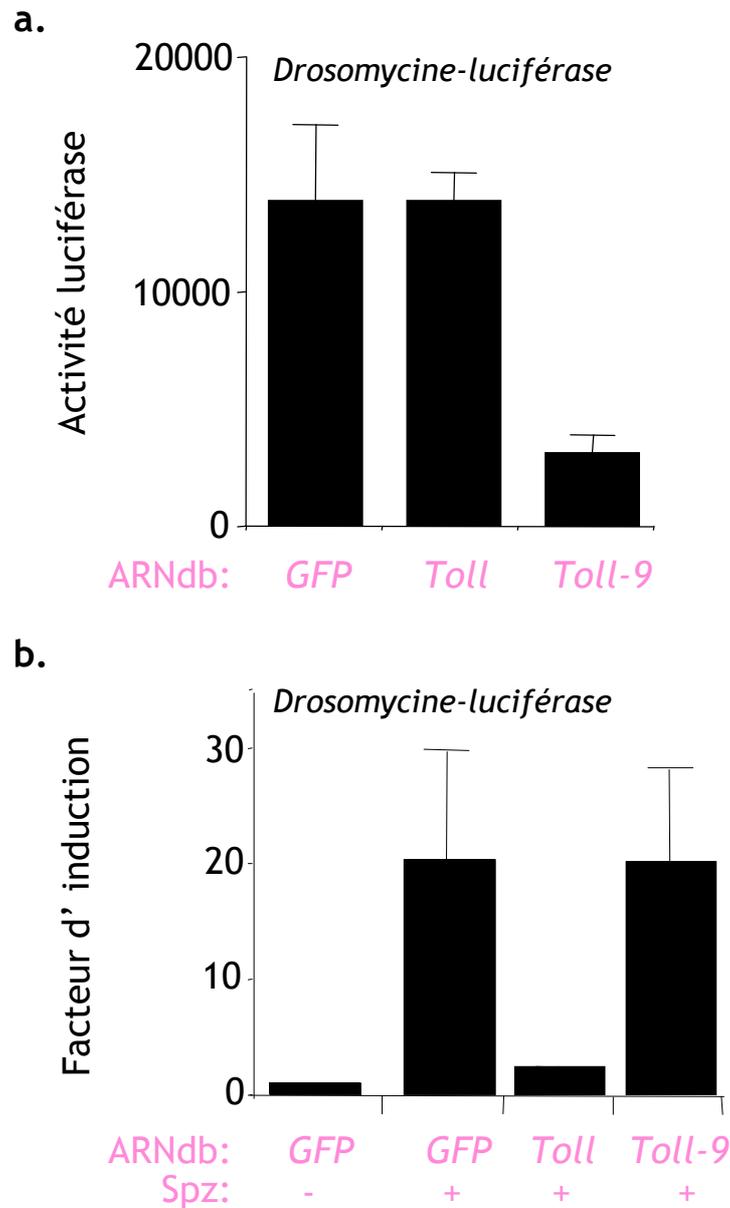
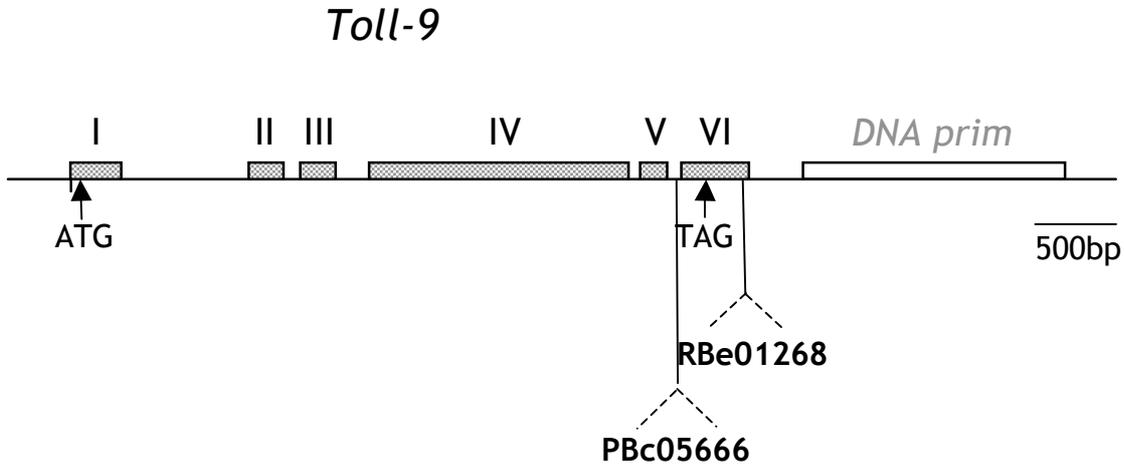
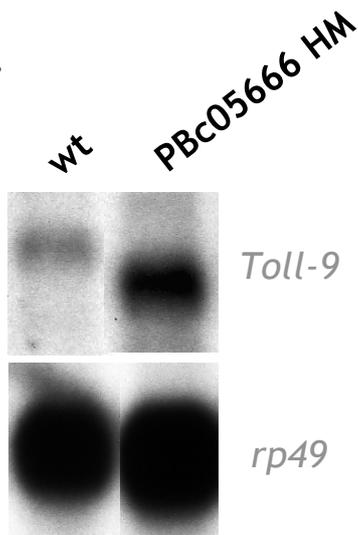


Figure 13: *Toll* et *Toll-9* activent le promoteur de la *drosomycine* de façon indépendante. **a:** *Toll-9* active le promoteur de la *drosomycine* sans *Toll*. Les cellules MT-Toll9 ont été co-transfectées avec de l'ARN double-brin correspondant à la *GFP* (Green Fluorescent Protein) qui sert de témoin négatif, à *Toll* ou à *Toll-9* et avec un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *drosomycine*. Elles sont ensuite stimulées au cuivre pour induire le promoteur *métallothionine*. **b:** L'activation *Toll*-dépendante du promoteur de la *drosomycine* par *Spätzle* ne dépend pas de *Toll-9*. Les cellules S2 sont co-transfectées avec de l'ARN double-brin correspondant à la *GFP*, à *Toll* ou à *Toll-9*, avec un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *drosomycine* et avec un vecteur exprimant (+) ou non (-) *Spätzle*. Le facteur d'induction est calculé par rapport à l'activité luciférase obtenue après transfection du vecteur d'expression vide. Pour a et b, les expériences sont réalisées en triplicat et les graphes montrent la moyenne et l'écart-type des résultats.

a.



b.



c.

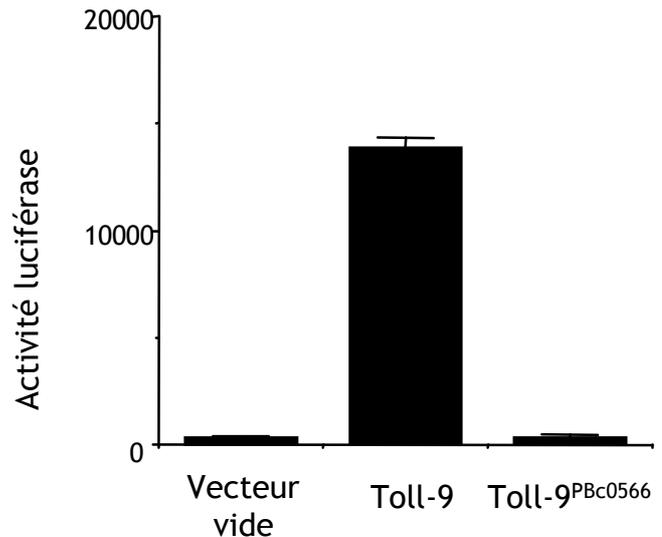


Figure 14: L'allèle *Toll-9*^{PBC05666} est un mutant de *Toll-9*. a: Représentation schématique du locus *Toll-9* montrant l'insertion des transposons PBC05666 et RBe01268. Les codons initiateur et terminateur du gène *Toll-9* sont indiqués. *DNA prim*: DNA primase. b: La taille du transcrit *Toll-9* est réduite dans la lignée PBC05666. Les ARNm d'individus sauvages ou de la lignée PBC05666 ont été analysés par Northern Blot avec une sonde correspondant à *Toll-9*. *rp49* sert de contrôle de la quantité d'ARN déposée dans chaque puit. c: L'allèle *Toll-9*^{PBC05666} n'active pas le promoteur de la *drosomycine*. Les cellules S2 ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression vide, ou exprimant *Toll9* ou *Toll9*^{PBC05666}, ainsi qu'avec un plasmide renfermant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *drosomycine*.

domaine TIR (données non montrées). Nous avons cloné cet allèle dans un vecteur d'expression et montré que l'allèle *Toll-9^{PBc05666}* n'est plus capable d'activer le promoteur de la *drosomycine* dans des cellules S2 transfectées (Figure 14c). Pour ce qui est de la lignée RBe01268, l'insertion du transposon dans les séquences 3' non traduites du gène ne semble pas perturber l'expression. Il ne s'agit donc vraisemblablement pas d'une lignée mutante.

III.3.1 La réponse systémique des adultes de la souche PBc05666 est normale.

Nous avons tout d'abord testé la réponse systémique des adultes de la lignée PBc05666, en les infectant par les microorganismes infectieux couramment utilisés au laboratoire, la bactérie à Gram-positif *Micrococcus luteus*, la bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli* et le champignon *Beauveria bassiana*. Suite à ces infections, les individus de la lignée PBc05666 activent tout à fait normalement la transcription des gènes des différents peptides antimicrobiens (Figure 15a et données non montrées). De même, leur survie à des infections par *E.coli* et *B.bassiana* est tout à fait comparable à celle d'individus sauvages (Figure 15b). Des recherches sont menées au laboratoire pour étudier la réponse antivirale de la drosophile, en particulier la réponse au «*Drosophila C Virus*» ou DCV. La réponse à ce virus de la famille des *picornaviridae* n'implique ni la voie Toll ni la voie IMD. Nous avons testé la survie de la lignée PBc05666 après infection virale, et montré que ces individus ne sont pas plus sensibles au DCV que des mouches sauvages (données non montrées).

III.3.2 La réponse systémique des larves PBc05666 est sauvage.

Toutes ces expériences ayant été menées sur des individus adultes, nous nous sommes ensuite intéressés à la réponse immunitaire des larves, dans l'espoir d'y trouver un rôle pour Toll-9. Des larves de troisième stade ont été infectées par piqûre avec *Micrococcus luteus* et *Escherichia coli*, et l'expression des transcrits des peptides antimicrobiens a été analysée par Northern Blot. Cette analyse a montré une réduction de l'expression du transcrit de la défensine (Figure 16).

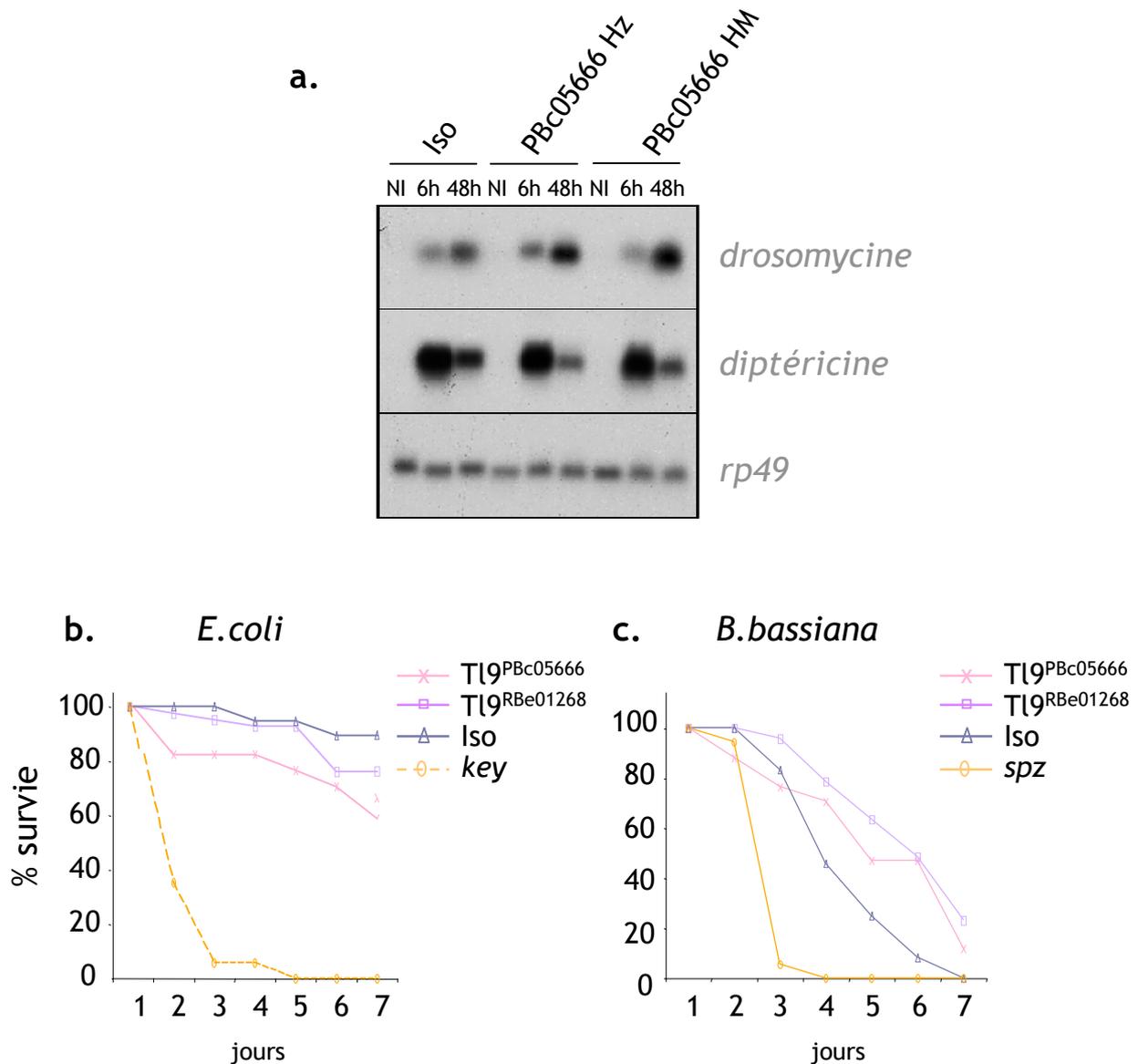


Figure 15: La réponse immunitaire systémique de la lignée PBc05666 est normale.

a: Les transcrits des peptides antifongique Drosomycine et antibactérien Diptéricine sont normalement induits après infection dans la lignée PBc05666. Des adultes des lignées Iso (Isogéniques Exelixis, le contexte génétique dans lequel les transposons ont été insérés) et PBc05666 (Hz: hétérozygotes, HM: homozygotes) ont été infectés ou non (NI: non infecté) par piqûre septique avec un mélange de la bactérie à Gram-positif *Micrococcus luteus* et de la bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli*. Les mouches sont récoltées 6h et 48h après infection, leur ARN total est extrait et analysé par Northern Blot. Les sondes hybridées sont indiquées à droite. rp49 sert de contrôle de la quantité d'ARN déposé dans chaque puit.

b: La survie des individus PBc05666 à une infection par *E.coli* est normale. Les individus sont infectés par piqûre septique avec une aiguille trempée dans un culot de bactéries à Gram-négatif *E.coli*.

c: La survie des individus PBc05666 à une infection naturelle par le champignon entomopathogène *B.bassiana* est normale. Pour b et c, les survivants sont comptés chaque jour pour établir la courbe de survie. Key: contrôle de susceptibilité de la voie IMD, Spz, contrôle de susceptibilité de la voie Toll.

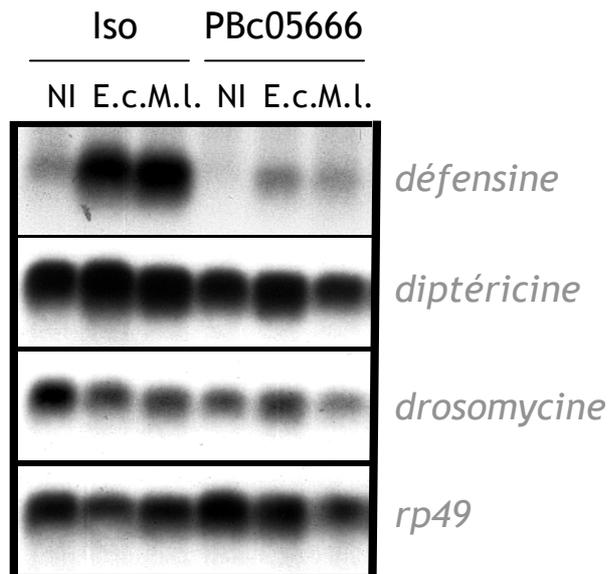


Figure 16: L'induction de la *defensine* dans les larves PBc05666 semble réduite 6h après infection. Des larves de troisième stade sont piquées avec une aiguille propre (NI: Non infecté) ou trempée dans un culot de bactéries à Gram-négatif *E.coli* (E.c.) ou à Gram-positif *M.luteus* (M.l.). Les ARNs sont extraits 6h après infection et analysés par Northern Blot. Les sondes hybridées sont indiquées sur la droite. *rp49* sert de contrôle de la quantité d'ARN déposée dans chaque puit.

Malheureusement, en refaisant la même expérience plusieurs fois, nous n'avons pas pu confirmer ce résultat encourageant. Nous avons alors testé la réponse des larves à une infection naturelle. Bruno Lemaître et coll. ont montré que la bactérie phytopathogène *Erwinia carotovora carotovora*, lorsqu'elle est mélangée à la nourriture de larves de troisième stade, induit une réponse immunitaire (Basset et al., 2000). Suite à ce type d'infection, on détecte par Northern Blot l'expression des transcrits des peptides antimicrobiens au même niveau dans la lignée PBc05666 que dans des larves sauvages (données non montrées).

III.3.3 Analyse de la réponse de la lignée PBc05666 à d'autres pathogènes.

Nous avons alors décidé de tester une batterie de pathogènes différents. En effet, si Toll-9 fonctionne comme un TLR activé par un PAMP particulier, il est fort possible qu'il réponde à une bactérie ou un champignon particulier. Parmi les microorganismes testés figure un membre de la famille des bacilles à Gram-positif, *Bacillus megaterium*. La membrane des bacilles à Gram-positif contient entre autres du DAP-Peptidoglycane, une forme de Peptidoglycane caractéristique des bactéries à Gram-négatif (voir discussion). Les bacilles induisent donc la voie IMD et la synthèse de *diptéricine*. Ils induisent également l'expression de *drosomycine*, 6 et 24 heures après infection. La première expérience que nous avons effectuée a montré une diminution de l'expression de la *drosomycine* 6 heures après infection par *Bacillus megaterium* dans les adultes de la lignée PBc05666 (Figure 17) ; par RT-PCR quantitative, nous avons observé une réduction de plus de 40% de l'expression de *drosomycine* dans la lignée PBc05666 (données non montrées). Mais lorsque nous avons refait la même expérience peu de temps après, la réponse à *Bacillus megaterium* est apparue tout à fait normale. Les bacilles ont la capacité de former des endospores extrêmement résistants lorsque le milieu est appauvri. La composition de la paroi de ces spores étant différente de celle des bacilles, nous avons pensé que la variation du phénotype était due à des variations de nos cultures bactériennes. Nous avons comparé la réponse à des bacilles en phase exponentielle de croissance à celle de spores cultivés dans un milieu spécial favorisant la formation d'endospores. Malgré tout, nous n'avons pu retrouver les

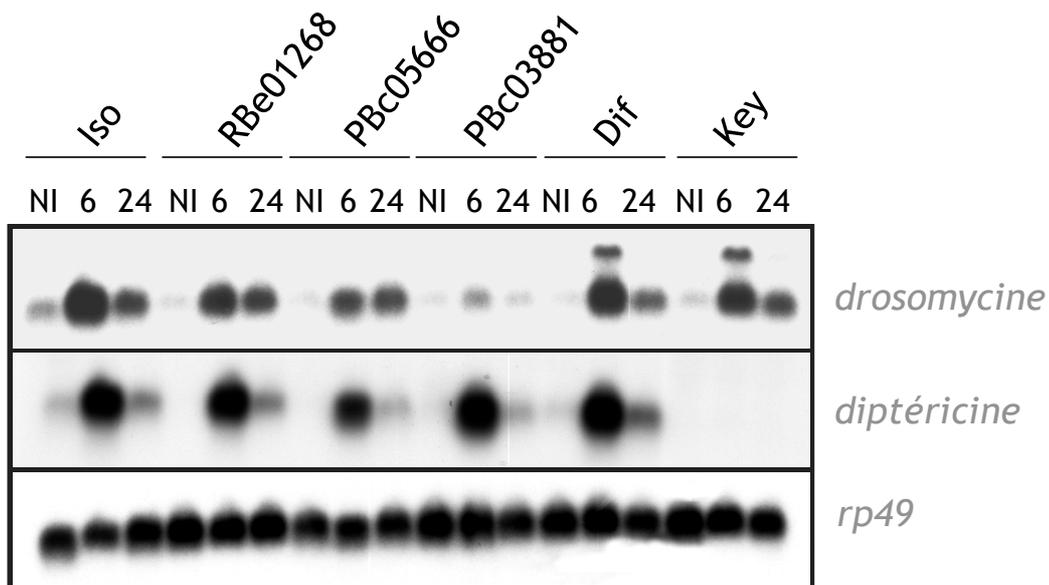


Figure 17: L'induction de la *drosomycine* semble réduite 6h après infection par *Bacillus megaterium* dans les adultes PBC05666. Les individus sont infectés ou non (NI: non infecté) par piqûre septique avec un culot de bacilles. Les ARNs sont extraits 6 et 24h post-infection et analysés par Northern Blot. Les sondes hybridées sont indiquées à droite. rp49 sert de contrôle de la quantité d'ARN déposé dans chaque puit. Les individus PBC03881 sont des mutants pour DmMyD88 et servent, ainsi que les mutants Dif, de contrôle de susceptibilité de la voie Toll. Les individus Key servent de contrôle de susceptibilité de la voie IMD.

conditions dans lesquelles la réponse à *Bacillus megaterium* est compromise dans la lignée PBc05666. De plus, en testant d'autres membres de la famille des bacilles, nous n'avons pas observé de différences entre la réponse de mouches sauvages et celle de la lignée PBc05666. Tout cela nous a conduit à penser que la diminution de l'expression de *drosomycine* observée était un artefact, provenant soit d'une contamination de nos cultures bactériennes, soit d'une fragilité de la lignée, qui ne serait pas forcément liée à la présence des transposons dans le gène *Toll-9*.

III.4 Patron d'expression de Toll-9

La difficulté à trouver un phénotype pour les individus mutants pour *Toll-9* reflète peut-être le fait que l'expression de *Toll-9* est spécifique de certains tissus. En effet, par Northern Blot, on détecte relativement faiblement l'expression du transcrit *Toll-9*. Afin de localiser les sites d'expression de *Toll-9*, nous avons construit une lignée transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *Toll-9* et étudiée son schéma d'expression *in vivo*. Comme nous ne savons pas exactement où commence et où finit le promoteur de *Toll-9*, nous avons cloné un fragment contenant les 2 kilobases de séquence en amont du codon initiateur ATG du gène. Nos données préliminaires montrent que la GFP est exprimée de façon très spécifique dans les parties antérieure et moyenne de l'intestin moyen des larves transgéniques (Figure 18, voir flèches). Nous avons confirmé ce résultat par RT-PCR, et montré que *Toll-9* est bien exprimé dans le tube digestif de larves sauvages. Il est également exprimé dans les tubes digestifs de larves RBe01268, mais pas dans les larves PBc05666, ce qui confirme que cette lignée est une lignée mutante pour *Toll-9* (Figure 19). Ceci pourrait expliquer pourquoi nous avons eu du mal à trouver un phénotype dans la lignée PBc05666, puisque nous avons toujours considéré l'animal entier. Si ces données sont confirmées par des expériences d'hybridation *in situ*, il nous faudra nous intéresser aux agents infectieux induisant une réponse immunitaire dans l'intestin pour trouver la fonction de Toll-9. Il faut cependant considérer que les séquences que nous avons clonées ne correspondent pas forcément au promoteur physiologique de *Toll-9* et il est possible que d'autres régions régulatrices soient nécessaires pour l'expression de *Toll-9* dans d'autres tissus.

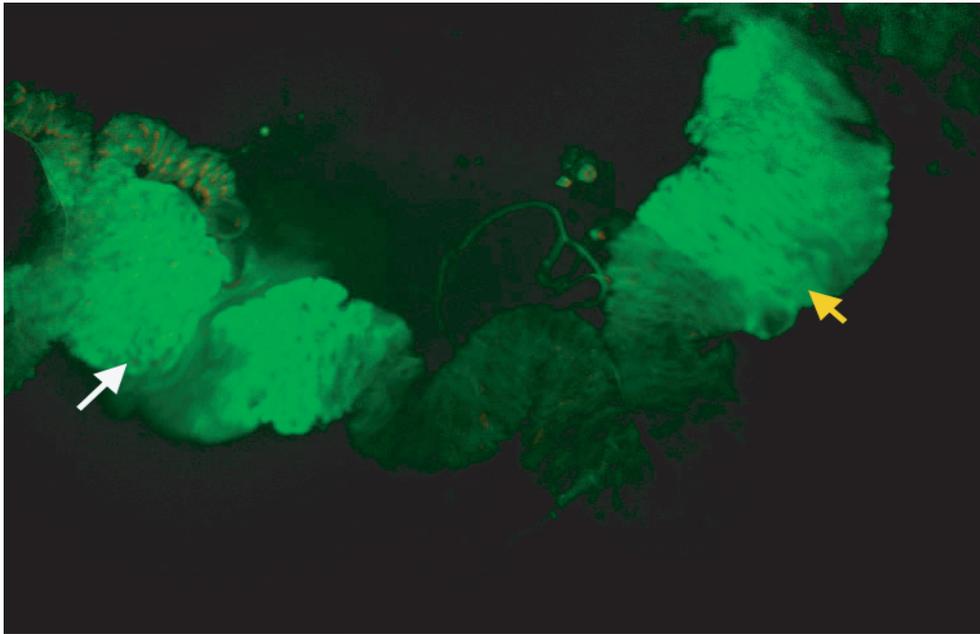


Figure 18: Les séquences 5' non traduites de *Toll-9* dirigent l'expression de la GFP dans les parties antérieure et moyenne de l'intestin moyen des larves. Les larves transgéniques portant le gène rapporteur *GFP* (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur *Toll-9* montrent une fluorescence localisée à la partie antérieure (flèche blanche) et moyenne (flèche jaune) de l'intestin moyen.

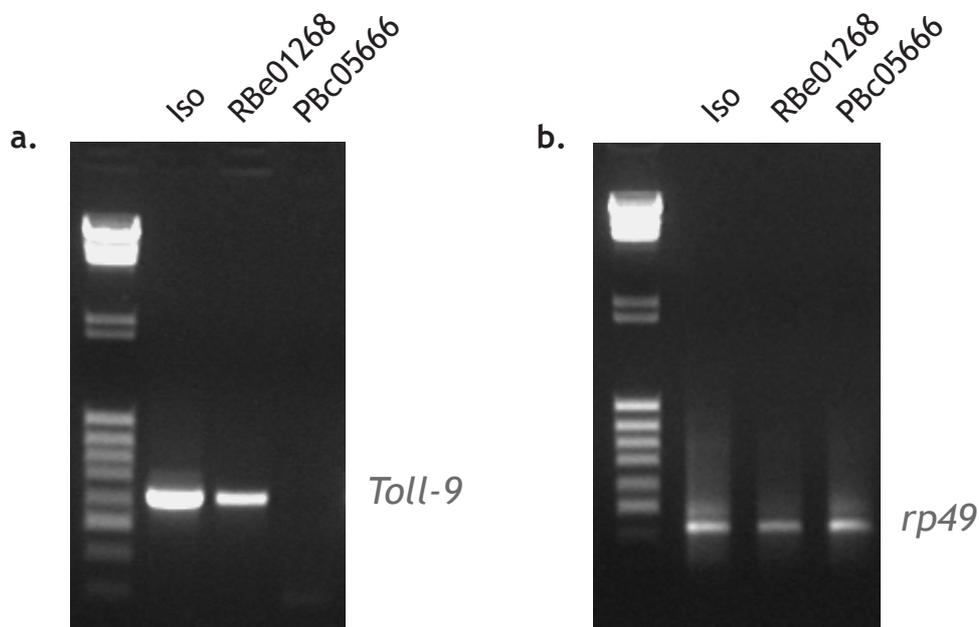


Figure 19: *Toll-9* est exprimé dans le tube digestif de larves sauvages. **a.** Les tubes digestifs de larves du troisième stade sont disséqués et l'ARN extrait est utilisé comme matrice pour la reverse transcription. La PCR est effectuée avec des amorces spécifiques à *Toll-9*, localisées dans deux exons différents. La taille des bandes obtenues correspond à la taille prédite de l'ADNc de *Toll-9*. On détecte l'expression de *Toll-9* dans les lignées sauvage (Iso) et RBe01268 mais pas dans les tubes digestifs des larves de la lignée PBc05666. **b.** Des oligonucléotides spécifiques de la protéine ribosomale *rp49* sont utilisés pour une PCR qui permet de vérifier l'homogénéité des quantités d'ADNc obtenues après la reverse transcription.

DISCUSSION

Au cours de ce travail, j'ai caractérisé un nouvel adaptateur à domaine TIR de la voie Toll, DmMyD88. L'étude de cette molécule révèle un certain nombre de différences entre la signalisation par le récepteur Toll et la signalisation par les TLRs de mammifères. Ces différences sont abordées dans la première partie de cette discussion. D'autre part, mes résultats indiquent que la majorité des récepteurs Toll de drosophile signalent de façon DmMyD88-indépendante. Les implications de cette observation seront discutées. Finalement, les résultats obtenus infirment notre hypothèse initiale sur le rôle des récepteurs Toll dans la réponse immunitaire de la drosophile, en particulier pour l'activation de la voie IMD. L'identité des PRRs utilisés pour détecter le non-soi infectieux chez la drosophile est décrite dans la troisième partie de la discussion.

I Le complexe récepteur-adaptateur dans les voies Toll et TLR.

I.1 Le complexe Toll/DmMyD88/Tube chez la drosophile

Nous avons montré que DmMyD88 est un adaptateur de la voie Toll, aussi bien chez l'adulte lors de la réponse immunitaire que chez l'embryon au cours de la mise en place de l'axe dorso-ventral. Jusqu'alors, Tube était considéré comme l'homologue fonctionnel de l'adaptateur MyD88 des mammifères. En effet, des analyses génétiques ont montré que *tube* est nécessaire à la transduction du signal résultant de l'activation du récepteur Toll lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon, et notamment au recrutement de la kinase Pelle (Grosshans et al., 1994). De plus, Lemaître et collègues ont montré son implication dans la réponse immunitaire après une infection fongique (Lemaitre et al., 1996). Tube possède, comme Pelle, un Death Domain (DD) amino-terminal et sa partie C-terminale est composée de motifs appelés Tube Repeats. Pelle, quant à elle, possède dans sa partie C-terminale un domaine sérine/thréonine kinase. Le DD est une famille de repliements protéiques caractéristiques qui fut identifiée dans des protéines impliquées dans l'apoptose, comme par exemple le récepteur du TNF. Ces domaines peuvent interagir entre eux de façon homotypique et sont donc des modules d'interaction protéine-protéine. Des études de cristallographie ont montré que Tube et Pelle forment un hétérodimère grâce à l'interaction de leurs DD respectifs. Des mutations dans les acides aminés impliqués dans cette interaction conduisent à l'inactivation partielle ou totale du complexe et à des défauts plus ou moins graves dans l'embryogénèse. La gravité du phénotype dépend de l'activité résultante de l'hétérodimère Tube-Pelle. L'interaction entre Tube et Pelle engage des acides aminés chargés négativement du DD de Tube (Xiao et al., 1999).

La découverte d'un homologue de MyD88 chez la drosophile et de son implication dans la voie Toll pose donc la question suivante: «Comment fonctionne le complexe DmMyD88-Tube-Pelle chez la drosophile?». Dans un papier publié par Horng et Medzhitov peu de temps avant notre premier article, les auteurs montrent que DmMyD88 active la voie Toll et que cette activation est bloquée par une version dominant-négative de Pelle, ce que nous avons montré

également. Les expériences d'immunoprécipitations présentées dans cet article montrent qu'une version tronquée de DmMyD88, contenant le domaine TIR et l'extension C-terminale de la molécule, coimmunoprécipite avec Toll (Horng and Medzhitov, 2001). Le Death Domain de DmMyD88 coimmunoprécipite avec Pelle et avec Tube. Nous avons nous-mêmes montré que le domaine TIR de DmMyD88 coimmunoprécipite avec Toll, et que DmMyD88 est associé avec Pelle dans les cellules S2. D'autres études menées par le groupe de Steven Wasserman ont confirmé, par des expériences de RNAi *in vitro*, une relation épistatique linéaire entre *DmMyD88*, *Tube* et *Pelle*, dans laquelle *Tube* agit en aval de *DmMyD88* et en amont de *Pelle* (Sun et al., 2002). Dans des expériences d'immunoprécipitation, DmMyD88 interagit avec le Death Domain de Tube et faiblement avec celui de Pelle. L'interaction de DmMyD88 avec le DD de Pelle est fortement augmentée par la coexpression du DD de Tube. Des expériences menées avec des mutants *tube* et *pelle* montrent que DmMyD88 et Tube interagissent *via* leurs DD, et que Pelle doit se lier directement au DD de Tube pour rejoindre le complexe (Sun et al., 2002). Ces résultats sont confirmés par des expériences de double-hybride menées dans la levure par l'équipe de C. Nüsslein-Volhardt, qui montrent une interaction directe entre DmMyD88 et Tube. Cette interaction a lieu également dans le mutant *kra*⁵⁶ qui porte une mutation non-sens dans le domaine TIR de DmMyD88, indiquant que l'interaction ne nécessite pas le domaine TIR de DmMyD88 (Charatsi et al., 2003). En corrélation avec ce qu'a observé Wasserman, ces expériences de double-hybride n'ont pas détecté d'interaction directe entre DmMyD88 et Pelle. Il faut donc un complexe de trois DD recruté à la membrane pour permettre la transduction du signal résultant de l'activation du récepteur Toll.

Notre étude du mutant PBc03881 de DmMyD88 a également montré l'importance de l'extension C-terminale (CTE) de DmMyD88. Le fait que la protéine DmMyD88^{PBc03881} mutante soit stable démontre que la présence de l'extension CTE est nécessaire à la fonction de DmMyD88, soit parce qu'elle régule le repliement de la protéine, soit parce qu'elle est nécessaire pour son interaction avec le complexe récepteur-adaptateur ou avec un autre composant encore inconnu. De façon intéressante, cette extension est absente de la protéine MyD88 de mammifère, mais on la trouve chez le moustique *Anopheles gambiae*.

Un papier publié récemment par l'équipe de S.Wasserman apporte des informations biochimiques quant à la séquence des événements suivant l'activation de la voie Toll (Sun et al., 2004). Leurs expériences montrent que DmMyD88 et Tube existent sous la forme d'un complexe par l'interaction entre leurs DD à l'état de repos et qu'une fois activé, Toll recrute DmMyD88 via son domaine TIR. Ceci explique notre observation selon laquelle le DD de DmMyD88 a un effet dominant-négatif sur l'activation de la voie Toll, puisque bien que lié à Tube, il ne peut être recruté par Toll. Cette observation était surprenante étant donné que chez les mammifères, c'est le domaine TIR de MyD88 qui a cette propriété. Ceci implique des différences dans l'activation du complexe récepteur-adaptateur chez la drosophile et les mammifères, qui seront discutées plus bas. Une fois que le complexe DmMyD88-Tube est recruté par Toll, Tube peut recruter Pelle. Le DD de Tube apparaît ainsi comme un module d'interaction bivalent, pouvant interagir à la fois avec le DD de DmMyD88 et avec celui de Pelle, ceci à travers des interactions impliquant des acides aminés chargés positivement dans le cas de l'interaction avec DmMyD88, ou négativement dans le cas de l'interaction avec Pelle. La kinase Pelle n'interagit avec Tube qu'une fois que le complexe DmMyD88-Tube a été recruté par le récepteur Toll activé (Figure 20).

Le recrutement de Pelle au complexe conduit à l'autophosphorylation de la kinase et mènera finalement à la translocation nucléaire des facteurs de transcription tels que Dorsal et Dif. De plus, il a été montré que Pelle peut phosphoryler Tube *in vitro* (Grosshans et al., 1994; Shen and Manley, 1998), ce qui pourrait mener au désassemblage de complexes protéiques contenant Tube (Towb et al., 2001). Cette hypothèse est confortée par le fait que dans des expériences de double-hybride, une version catalytiquement inactive de Pelle interagit plus fortement avec Tube que ne le fait la kinase sauvage (Edwards et al., 1997). Ainsi, Pelle pourrait agir comme un régulateur négatif de la voie Toll. Il reste encore à identifier une autre cible de Pelle, qui une fois activée mènerait à la dégradation de l'inhibiteur Cactus, permettant ainsi la translocation nucléaire des facteurs de transcription Dorsal et Dif.

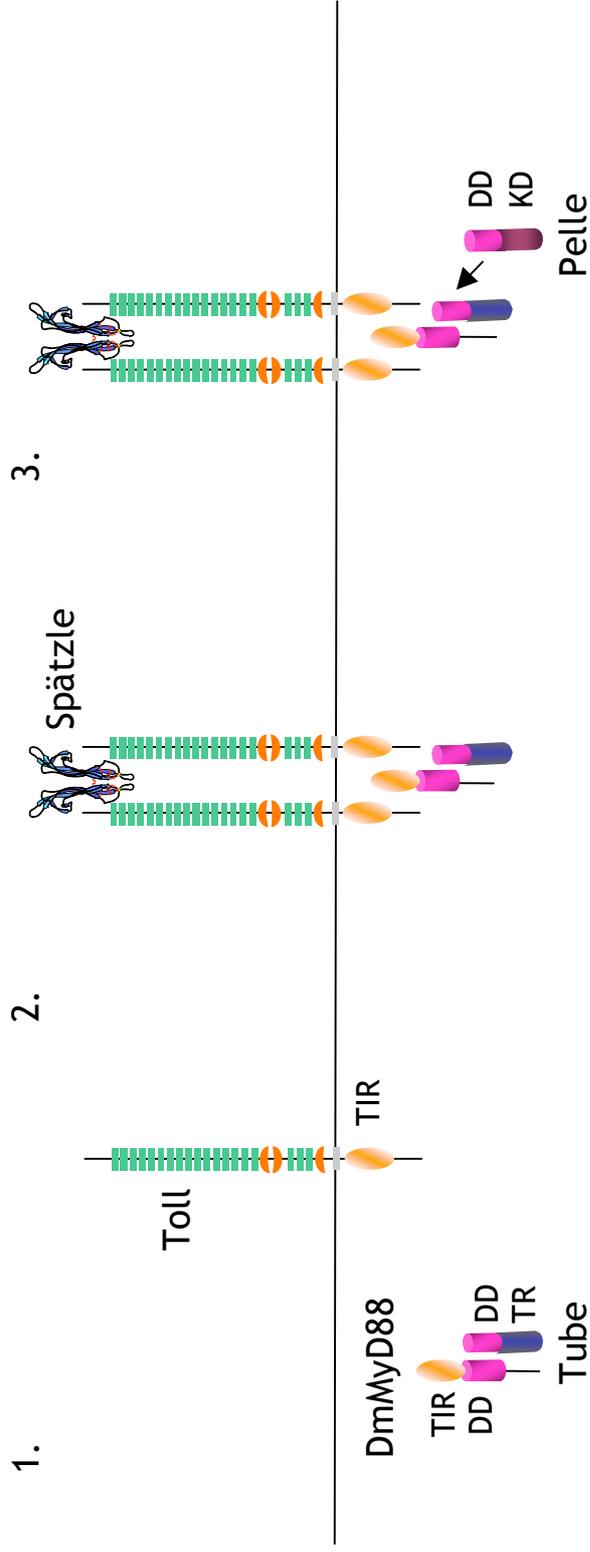


Figure 20: Formation du complexe récepteur-adaptateur de la voie Toll. Les Death Domains (DD) de DmMyD88 et Tube interagissent à l'état de repos (1). La fixation du ligand de Toll Spätzle provoque la dimérisation du récepteur et le complexe DmMyD88-Tube est recruté au domaine TIR de Toll *via* le domaine TIR de DmMyD88 (2). Tube peut alors recruter Pelle grâce à l'interaction de leurs DD respectifs (3). TR: Tube Repeats, KD: Kinase Domain.

I.2 Le complexe TLR4/MyD88/Mal chez les mammifères

Chez les mammifères, MyD88 fut tout d'abord impliqué dans le recrutement d'une sérine/thréonine kinase, IRAK, un orthologue de Pelle, au récepteur de l'Interleukine-1 (IL1-R) (Wesche et al., 1997). Il fut par la suite démontré que MyD88 joue le rôle d'adaptateur dans la voie de signalisation TLR, où elle induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B via IRAK (Medzhitov et al., 1998). Quand d'autres TLRs furent identifiés, il s'avéra que MyD88 intègre les signaux provenant de la majorité des TLRs et active NF- κ B en réponse à une grande variété de ligands. De ce fait, MyD88 était considéré comme l'homologue fonctionnel de Tube chez les mammifères, ce jusqu'à l'identification de l'homologue DmMyD88. Toutefois, l'étude de souris KO pour *MyD88* révéla l'existence d'une voie de signalisation MyD88-indépendante en aval de certains TLRs. En effet, dans des souris *MyD88*^{-/-}, l'activation de NF- κ B par TLR4 n'était pas abolie, mais simplement retardée. Cette observation conduit à rechercher un autre adaptateur en aval des TLRs. C'est ainsi que fut identifié Mal/TIRAP (MyD88 adapter-like/TIR domain containing adaptor protein). Mal/TIRAP agit en aval de TLR2 et TLR4, mais l'analyse de souris KO pour Mal/TIRAP montre que ce n'est pas l'adaptateur responsable de la voie MyD88-indépendante. Il s'agit plutôt d'un cofacteur de MyD88 nécessaire à la transduction du signal en aval de ces deux récepteurs (voir introduction).

On pourrait donc apparenter la fonction de Mal/TIRAP à celle de Tube chez la drosophile. De façon fort intéressante, l'alignement des séquences de Mal/TIRAP et de Tube montre une forte homologie entre la région N-terminale de Mal/TIRAP et la région C-terminale de Tube (Dunne et al., 2003). De ce fait, Mal/TIRAP apparaît comme l'homologue «miroir» de Tube, possédant un domaine TIR plutôt qu'un DD. Cette différence peut expliquer pourquoi chez les mammifères, c'est le domaine TIR de MyD88 qui possède la propriété dominant-négative.

Des expériences de modélisation moléculaire menées par l'équipe de Nick Gay suggèrent que les domaines TIR de MyD88 et Mal/TIRAP se lient au domaine TIR de TLR4 par des sites de liaison indépendants. De plus, les domaines TIR de MyD88 et Mal/TIRAP interagissent de façon directe par l'intermédiaire d'un troisième site

de liaison. Ces prédictions suggèrent ainsi que les trois domaines TIR concernés sont bivalents, alors que dans le cas de TLR2, la modélisation suggère que les deux adaptateurs se lient à la même surface du domaine TIR du récepteur (Dunne et al., 2003). Il apparaît donc que le complexe récepteur adaptateur TLR4/MyD88/Mal/TIRAP réutilise de façon un peu différente les mêmes domaines d'interaction protéiques que le complexe Toll/DmMyD88/Tube chez la drosophile.

En ce qui concerne le recrutement de la kinase en aval, la situation chez les mammifères est plus complexe que chez la drosophile, puisqu'il existe en effet plusieurs kinases IRAK, qui pourraient donc être recrutées par des adaptateurs différents. En effet, en plus de Mal/TIRAP, nous avons vu dans l'introduction que trois autres adaptateurs à domaine TIR ont été identifiés chez les mammifères, TRIF/TICAM-1, TRAM/TIRP, et SARM. Parmi ces molécules, seule SARM possède un homologue chez la drosophile.

A l'inverse de ce qui se passe chez les mammifères, où la majorité des TLRs interagissent avec MyD88, chez la drosophile, seuls Toll et Toll-9 ont cette propriété. D'un point de vue phylogénique, ceci est très surprenant, puisque les séquences des domaines TIR de ces deux récepteurs sont relativement éloignées. On se serait attendu à ce que MyD88 puisse interagir avec Toll-5 ou 18w, dont les domaines TIR ressemblent fortement à celui de Toll. Cependant, au cours des expériences de double-hybride menées par plusieurs équipes indépendantes, aucune interaction directe n'a été observée entre le domaine TIR de Toll et DmMyD88 (Charatsi et al., 2003; Edwards et al., 1997), ce qui pourrait suggérer qu'il manque encore un acteur du complexe récepteur-adaptateur chez la drosophile, acteur qui ferait le lien entre le récepteur et DmMyD88.

La majorité des récepteurs Toll de la drosophile semble donc fonctionner de façon DmMyD88-indépendante, à l'inverse des TLRs de mammifères. Cette observation implique l'existence d'un autre adaptateur nécessaire à la transduction du signal suite à l'activation des autres membres de la famille Toll.

II Les récepteurs Toll DmMyD88-indépendants de la drosophile.

Des neuf récepteurs de la famille Toll chez la drosophile, seuls Toll, Toll-5 et Toll-9 activent le promoteur NF- κ B-dépendant de la *drosomycine* dans les cellules S2. Nous avons cherché une interaction entre DmMyD88 et tous les Tolls et ne l'avons détectée par immunoprécipitation que pour Toll et Toll-9. Ceci est surprenant en ce qui concerne Toll-5, puisque dans les cellules S2, l'activation du promoteur de la *drosomycine* par ce récepteur est bloquée par la version dominant-négative de DmMyD88. Il est toutefois possible que nos expériences n'aient pas permis de détecter une interaction qui existe, ou alors que l'interaction est indirecte, par exemple *via* Toll. En effet, le patron d'expression embryonnaire de ces deux récepteurs montre que Toll-5 est exprimé dans les mêmes tissus que Toll, à l'exception de l'épiderme et de l'embryon précoce, suggérant que Toll-5 pourrait être un co-récepteur de Toll dans certains tissus (voir Introduction et (Kambris et al., 2002)). Le résultat des expériences d'immunoprécipitations est moins surprenant en ce qui concerne les autres membres de la famille, puisqu'ils n'activent pas les promoteurs NF- κ B-dépendants des peptides antimicrobiens. Les autres Tolls activent peut-être des voies de signalisation totalement différentes, pour lesquelles ils utilisent un ou plusieurs autres adaptateurs. Si l'on raisonne en pensant que les domaines TIR des récepteurs Toll-2 à -8 interagissent avec un adaptateur possédant lui aussi un domaine TIR, le nombre de candidats se trouve considérablement réduit. En effet, le génome de la drosophile ne contient que deux gènes codant pour des protéines intracytoplasmiques à domaine TIR, *DmMyD88* et *CG7915*. Le gène *CG7915* code pour l'orthologue de l'adaptateur de mammifères SARM, que nous appelons DmTIR-1 (Figure 21).

Jusqu'à récemment, la protéine SARM n'avait de fonction connue dans aucun organisme. Toutefois, son orthologue TIR-1 vient d'être impliqué dans la réponse immunitaire du nématode *C.elegans*. Le laboratoire de Jonathan Ewbank a montré que le nématode possède un système de défense inductible et qu'il est capable de mettre en place une réponse appropriée selon que l'infection soit bactérienne ou fongique. *C.elegans* ne possède qu'un récepteur Toll, TOL-1, mais pas d'homologue

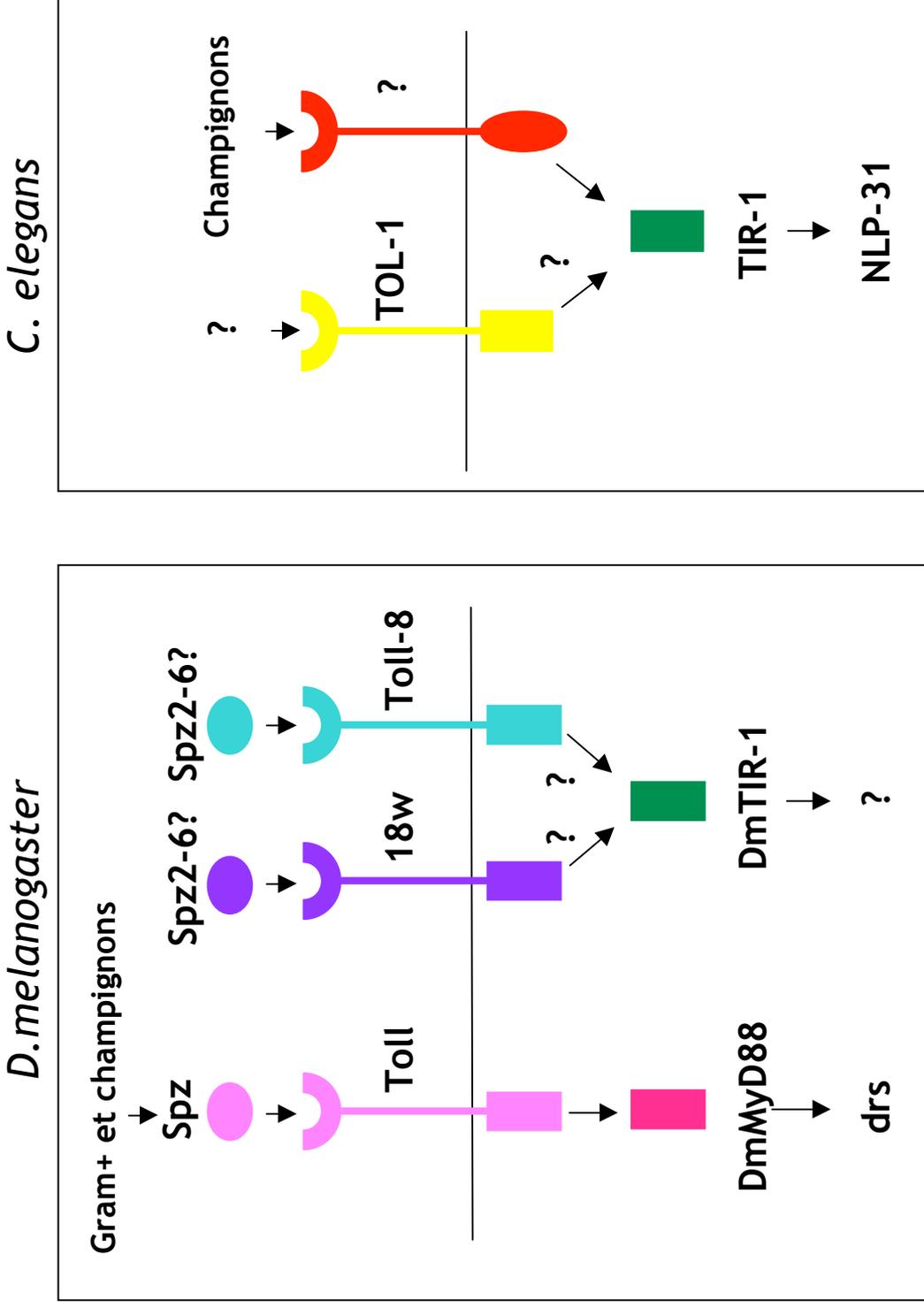


Figure 21: Signalisation antimicrobienne MyD88-indépendante chez la drosophile et le nématode. Le génome de la drosophile contient une seule autre molécule cytoplasmique à domaine TIR, DmTIR-1, qui représente le candidat évident pour fonctionner en aval des autres Tolls. DmTIR-1 est l'homologue de la molécule TIR-1 de *C.elegans*, qui régule l'expression inducible du peptide antifongique NLP-31, en réponse à l'activation d'un récepteur qui reste à identifier.

de NF- κ B. De plus, des mutants *tol-1* ne présentent pas de phénotype immunitaire, indiquant que la réponse immunitaire du nématode ne repose pas sur l'activation d'une voie Toll/TLR (Pujol et al., 2001). Suivant une infection fongique, le nématode exprime un peptide antifongique, NLP-31. L'expression d'un rapporteur *nlp-31::GFP* augmente après une infection par le champignon *Drechmeria coniospora*; ceci n'est pas compromis dans un mutant *tol-1*, suggérant que l'expression du peptide antifongique NLP-31 est indépendante du seul récepteur Toll présent chez le nématode. Par contre, lorsqu'on inactive *tir-1* par interférence à l'ARN (RNAi), on observe une diminution de la fluorescence due au rapporteur *nlp-31::GFP* avant et après infection, indiquant que *tir-1* agit comme un régulateur positif de *nlp-31*. Le fait qu'il subsiste tout de même de l'activité du rapporteur suggère néanmoins que *tir-1* n'est pas le seul régulateur de *nlp-31*. De la même façon, l'inactivation de *tir-1* par RNAi réduit l'expression constitutive d'un autre peptide antimicrobien, NLP-29, ainsi que son expression consécutive à une infection par *D.coniospora*. De plus, la survie des individus dans lesquels *tir-1* a été inactivé est réduite suite à l'infection. TIR-1, l'orthologue de SARM, joue ainsi un rôle important dans la réponse immunitaire du nématode (Couillault et al., 2004) (Figure 21).

Des études indépendantes menées par l'équipe de Frederick Ausubel ont montré que TIR-1 est requis pour la résistance à des infections bactériennes et que TIR-1 fonctionne en amont de PMK-1, un homologue de la MAP Kinase p38 mammifère (Liberati et al., 2004).

En plus de l'orthologue de TIR-1, la drosophile possède également des peptides de type NLP. Ceux-ci sont induits lors d'une infection fongique (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001). De ce fait, nous nous sommes intéressés à DmTIR-1. Nous avons des données préliminaires montrant que son inactivation par RNAi n'a aucun effet sur l'induction de la *drosomycine* suite à une infection microbienne. A ce stade, nous ne pouvons donc pas établir de lien entre DmTIR-1 et Toll. Nous ne pouvons tester si DmTIR-1 joue le rôle d'adaptateur pour les récepteurs Toll-2 à Toll-8, puisque nous ne connaissons pas les gènes cibles activés par ces différents récepteurs. C'est pourquoi nous avons établi des lignées de drosophile transgéniques permettant la surexpression de versions constitutivement actives de Toll, 18w, Toll-8 et Toll-9. Grâce à la technique des puces à ADN, nous

espérons trouver des cibles encore inconnues des récepteurs Toll et ainsi élucider la fonction des récepteurs Tolls DmMyD88-indépendants. Nous avons choisi ces récepteurs en particulier parce que nous disposons de lignées mutantes pour ces quatre membres de la famille, ce qui nous permettra de valider les résultats des puces.

Chez la drosophile, les récepteurs Tolls DmMyD88-indépendants pourraient ainsi activer une ou plusieurs voies de signalisation différentes de celle utilisée par Toll, qui ne mèneraient pas à l'activation d'un promoteur NF- κ B-dépendant. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les plantes possèdent de nombreuses protéines à domaine TIR alors qu'elles ne semblent pas contenir de facteur de transcription de type NF- κ B. Il en est de même chez le nématode, qui possède un seul récepteur Toll, TOL-1, mais pas d'homologue NF- κ B. L'ensemble de ces observations suggère que les domaines TIR pourraient porter des fonctions NF- κ B-indépendantes, apparues précocément au cours de l'évolution. Découvrir la fonction des Tolls de drosophile pourrait ainsi révéler de nouvelles fonctions pour les TLRs de mammifères.

III «Pattern recognition» chez la drosophile

Les récepteurs Toll de la drosophile forment donc une famille phylogénétiquement distincte de la famille des TLRs de mammifères et il semble que cette distinction se retrouve également au niveau des fonctions remplies par ces récepteurs. Tandis que les TLRs apparaissent comme des «sentinelles» permettant la détection des pathogènes et l'activation d'une réponse de défense de l'organisme, nous n'avons pas d'indication que les Tolls de drosophile jouent le même rôle. De plus, bien que Toll contrôle la réponse de la drosophile à des infections fongiques ou par des bactéries à Gram-positif, il agit comme un récepteur de cytokine et non comme un PRR reconnaissant directement un motif microbien (Weber et al., 2003). De la même façon, nos résultats indiquent que la réponse aux bactéries à Gram-négatif n'implique pas un membre de la famille Toll chez la drosophile. Des expériences indépendantes ont permis l'identification d'autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes chez la drosophile. En effet, des expériences de mutagenèse montrent que des membres de la famille des Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) ainsi que de celle des Gram-negative Binding Proteins/ β -Glucan Recognition Proteins (GNBP/ β GRP) jouent le rôle de PRRs chez la drosophile (Figure 3).

III.1 Les PGRPs

III.1.1 Activation de Toll après une infection bactérienne à Gram-positif

Lors d'un crible du chromosome X, l'équipe de Julien Royet au laboratoire a identifié la lignée mutante *Semmelweis* (*seml*) (Michel et al., 2001). Le gène *seml* code un membre de la famille des PGRPs, PGRP-SA. La famille des PGRPs chez la drosophile compte 13 membres, qui peuvent être classés en deux sous-familles: 7 d'entre eux sont appelés «Small PGRPs», ou PGRP-S et les 6 autres sont des «Long PGRPs» ou PGRP-L. Les PGRP-S sont caractérisés par l'absence d'un domaine transmembranaire et la présence d'un peptide signal, suggérant qu'il

s'agit de molécules extracellulaires. La sous-famille des PGRP-L est plus hétérogène, puisqu'elle regroupe des molécules prédites comme étant transmembranaires ou intracytoplasmiques (revu dans (Royet, 2004)).

Les mutants *seml* sont sensibles à des infections par des bactéries à Gram-positif et l'expression de la *drosomyeine* est abolie ou considérablement réduite suite à des infections par ce type de bactéries. Pourtant, ces individus sont normalement résistants à des infections par des bactéries à Gram-négatif, mais aussi à des infections fongiques. Cette mutation est la première ayant démontré une fonction *in vivo* d'un PRR dans la réponse immunitaire d'un invertébré. L'activation de la voie Toll en réponse à une infection par des bactéries à Gram-positif reconnues par un PRR particulier suggèrait l'existence d'autres PRRs impliqués dans la reconnaissance des champignons d'une part et des bactéries à Gram-négatif d'autre part (Michel et al., 2001).

III.1.2 L'activation de la voie IMD dépend d'un membre de la famille des PGRPs

Cette hypothèse a été confortée par la découverte du rôle d'un autre membre de la famille, PGRP-LC, dans la réponse de la drosophile à des infections par des bactéries à Gram-négatif. Les individus mutants pour *PGRP-LC* présentent un phénotype de sensibilité accrue à des infections par des bactéries à Gram-négatif, alors qu'ils sont résistants aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif. PGRP-LC est une molécule transmembranaire et les expériences d'épistasie ont placé *PGRP-LC* en amont d'*imd*. Ces résultats faisaient de PGRP-LC un bon candidat pour être le récepteur de la voie IMD si recherché. Pourtant, le phénotype des mutants perte de fonction *PGRP-LC* est moins sévère que celui de mutants *kenny*, suggérant que PGRP-LC n'est pas le seul élément activant la voie *IMD* (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002). La surexpression d'un autre membre de la famille des PGRPs, PGRP-LE, conduit dans les larves à l'expression constitutive de la *diptéricine*, le marqueur de l'activation de la voie *imd* (Takehana et al., 2002). Toutefois, il reste encore à étudier le phénotype d'individus perte-de-fonction pour *PGRP-LE* pour l'impliquer de façon non équivoque dans la réponse aux bactéries à Gram-négatif.

III.1.3 La drosophile peut reconnaître différents types de peptidoglycane

La drosophile est ainsi capable de différencier différents types de microorganismes infectieux par l'intermédiaire de différents PGRPs. Quels sont les motifs microbiens reconnus exactement par ces PRRs?

La paroi des bactéries à Gram-positif est majoritairement composée de Peptidoglycane (PGN), tandis que celle des bactéries à Gram-négatif est composée de 20% de PGN sous une couche de LPS. De ce fait et aussi par homologie avec les mammifères où TLR4 reconnaît le LPS, on supposait que chez la drosophile, la voie IMD était activée en réponse au LPS. Il était alors surprenant que la reconnaissance des bactéries à Gram-positif et celle des bactéries à Gram-négatif implique des récepteurs censés reconnaître le PGN. Des études visant à comprendre ce qui semblait être un paradoxe ont montré qu'en fait, le LPS n'induit pas de réponse quand il est injecté dans la drosophile (Kaneko et al., 2004). Il s'avère en fait que le système immunitaire de la drosophile est capable de faire la différence entre deux types de PGN (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003). Les chaînes de PGN sont formées par la répétition d'un grand nombre de motifs monomériques. Ces monomères consistent en la liaison de deux sucres aminés, le N-acétyl-glucosamine (NAG) et le N-acétyl-muramide (NAM). Le résidu NAM porte un tétrapeptide, différent chez les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif. Dans le PGN des bactéries à Gram-positif, le troisième acide aminé de la chaîne latérale est une L-Lysine, tandis que dans celui des bactéries à Gram-négatif, on trouve un résidu diaminopimélique (DAP). On parle de LYS-PGN et de DAP-PGN.

La présence ou l'absence du résidu DAP dans le PGN apparaît comme un élément majeur de discrimination entre bactéries à Gram-négatif et bactéries à Gram-positif (Kaneko et al., 2004). Il reste encore à éclaircir comment la voie IMD peut reconnaître un constituant bactérien «enterré» sous une couche de LPS. On peut imaginer que du PGN est relargué lors des divisions bactériennes, ou que la paroi bactérienne est altérée par d'autres mécanismes provoquant le relarguage de PGN (Leulier et al., 2003).

Le système de la drosophile apparaît ainsi comme un système de détection raffiné, permettant la discrimination entre deux variations du même thème, deux types du même PAMP.

III.2 Rôle de la famille GGBP/GRPs dans l'activation de la voie Toll

I.1.1 Activation de la voie Toll en réponse aux infections fongiques

Le fait que Spätzle soit clivé dans les minutes qui suivent une blessure septique, ainsi que l'expression constitutive de la *drosomycline* dans des mutants *nec* déficients pour la serpine 43AC indique que les infections fongiques ou bactériennes à Gram-positif activent une ou des sérines protéases (Levashina et al., 1999).

Dans le but d'identifier ces sérine protéases, l'équipe de Jean-Marc Reichhart a criblé le chromosome X de la drosophile pour rechercher des mutations qui suppriment le phénotype *nec*. Ceci a permis d'identifier la mutation *persephone* (*psh*). Les mutants *psh* sont très sensibles aux infections fongiques, mais pas aux infections bactériennes. L'expression de la *drosomycline* suite à une infection fongique est sévèrement réduite dans les mutants *psh* par rapport aux individus sauvages. La mutation *psh* affecte une sérine protéase; c'est la première mutation qui affecte de façon spécifique la réponse aux champignons chez la drosophile (Ligoxygakis et al., 2002b).

Toutefois, le PRR activant la voie Toll suite à une infection fongique restait encore inconnu. Les membres de la famille des GGBP/GRPs étaient de bons candidats pour tenir ce rôle; en effet, les GRPs furent d'abord identifiés pour leur capacité à lier les β -glucanes fongiques (revu dans (Ferrandon et al., 2004)). De fait, une mutation perte-de-fonction dans le gène *GGBP-3* a été générée par l'équipe de Dominique Ferrandon et il apparaît que les mutants *GGBP-3^{hadès}* sont particulièrement sensibles aux infections fongiques (Gottar et al., 2004).

III.2.2 GNBP-1 forme un complexe avec PGRP-SA pour activer la voie Toll en réponse aux infections par les bactéries à Gram-positif.

Lors d'un autre crible mené au laboratoire, l'équipe de Dominique Ferrandon a identifié une mutation nommée *osiris* (*osi*) (Gobert et al., 2003). Le phénotype des mutants *osi* est identique à celui des mutants *seml*, c'est-à-dire qu'ils sont particulièrement sensibles à des infections bactériennes à Gram-positif, tout en ayant une réponse de type sauvage aux autres types d'infection. La mutation *osiris* correspond à l'insertion d'un transposon dans le gène codant pour un membre de la famille des GNBP, GNBP-1. Les résultats montrent que PGRP-SA et GNBP-1 forment un complexe pour reconnaître les bactéries à Gram-positif et ainsi activer la voie Toll. Une autre étude confirme les résultats de la mutagenèse, montrant que des individus dans lesquels le gène *GNBP-1* a été inactivé par interférence à l'ARN sont particulièrement sensibles aux infections par les bactéries à Gram-positif et ont le même phénotype que les mutants *seml* (Pili-Floury et al., 2004).

III.3 Rôle du TLR de la drosophile, Toll-9, dans la réponse immunitaire

Le récepteur Toll-9, qui ressemble plus aux TLRs de mammifères qu'aux Tolls de drosophile, est un candidat de choix pour nous aider à mieux comprendre l'évolution des mécanismes de reconnaissance du non-soi. En effet, comprendre sa fonction pourrait nous aider à mieux comprendre la fonction de la molécule ancestrale dont l'évolution a mené à l'apparition de la famille des TLRs.

Nous avons montré que Toll-9 peut activer le promoteur NF- κ B-dépendant de la *drosomycine*, à la fois dans les cellules S2 et *in vivo*, et qu'il utilise pour cela la même voie de signalisation que Toll. Nous avons également montré que Toll-9 interagit avec DmMyD88, comme Toll. Tous ces résultats tendent à impliquer Toll-9 dans la réponse immunitaire de la drosophile. Malheureusement, notre étude de mutants *Toll-9* ne nous a pas encore permis de trouver sa fonction exacte.

Tony Ip a proposé que Toll-9 est un récepteur constitutivement actif (Ooi et al., 2002). Bien que nous ne soyons pas d'accord avec l'alignement de séquences dont découle cette hypothèse, nous avons nous-mêmes observé que dans les cellules MT-Toll-9, l'activation du promoteur de la *drosomycine* est constitutive,

même en absence de stimulation du promoteur par le cuivre. Nous avons également construit des lignées transgéniques permettant la surexpression d'une version sauvage de *Toll-9*. Ceci mène à l'expression constitutive de *drosomycine*, ce qui tendrait à montrer que le récepteur est en effet constitutivement activé. Nous savons maintenant que *Toll-9* est exprimé dans l'intestin larvaire, or la *drosomycine* n'a jamais été détectée dans ce tissu lors des études faites sur la réponse épithéliale de la drosophile (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000). Ceci pourrait être dû au fait que lors de ces expériences, le germe provoquant la synthèse de ce peptide dans le tube digestif n'a pas été testé. Il est également possible que la voie menant à l'expression de la *drosomycine* n'est pas fonctionnelle dans l'intestin larvaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des expériences de spectrométrie de masse MALDI-TOF sur des intestins de larves surexprimant *Toll-9^{Δ^{LR}}*. D'après nos résultats préliminaires, on détecte dans ces échantillons un pic correspondant à la Drosomycine. On observe aussi ce pic, quoique plus faiblement, dans des intestins de larves surexprimant la version sauvage de *Toll-9* (données non montrées). Ceci indique que la voie de synthèse de la Drosomycine est fonctionnelle dans le tube digestif des larves. Toutefois, on ne peut en conclure que l'induction de la synthèse de Drosomycine par *Toll-9* dans ce tissu particulier est physiologique. En effet, il s'agit d'expériences dans lesquelles on force l'expression du récepteur. Ainsi, il est fort possible que les cellules de l'intestin qui expriment la Drosomycine dans ce cas ne sont pas celles qui expriment *Toll-9* à l'état sauvage. De la même façon, on peut envisager que, dans ce tissu, le promoteur de la *drosomycine* n'est pas la seule cible physiologique de *Toll-9* et que le récepteur active aussi d'autres gènes dans l'intestin.

En effet, si *Toll-9* peut activer le promoteur de la *drosomycine*, il n'est pas certain que ce soit sa seule cible. Les puces à ADN que nous voulons établir et que j'ai mentionnées plus haut devraient nous révéler d'autres cibles de *Toll-9*, que nous pourrions alors étudier au niveau de l'intestin.

Une des choses les plus intéressantes sera de savoir si *Toll-9* fonctionne comme un véritable PRR, c'est-à-dire s'il est activé directement par un PAMP, ou s'il est, comme *Toll*, activé par la liaison d'un ligand endogène de type cytokine. Etant donné que *Toll-9* ressemble plus aux TLRs qu'à *Toll*, il y a de fortes chances pour que *Toll-9* reconnaisse un PAMP particulier, comme ses homologues de

mammifères. Pour tester cette hypothèse, nous sommes en train de cloner le gène *Toll-9* dans un plasmide permettant son expression dans des cellules de mammifère. En collaboration avec Ruslan Medzhitov à Yale, nous allons tester les PAMPs qui activent les TLRs et nous espérons que cela nous permettra de trouver le ligand qui permet à Toll-9 d'induire la translocation nucléaire d'un facteur de transcription de type NF- κ B.

En conclusion, il apparaît que la réponse immunitaire repose sur des mécanismes de reconnaissance et d'activation différents chez la drosophile et chez les mammifères. Il semble que l'évolution ait privilégié la conservation de «cassettes moléculaires» plutôt que de voies de signalisation entières, comme le montre le complexe récepteur transmembranaire domaine TIR/adaptateur MyD88/kinase IRAK. En ce qui concerne le système de reconnaissance, il semble très différent chez la drosophile et chez les mammifères: il repose en effet sur la reconnaissance de motifs microbiens différents par des récepteurs différents. Par exemple, les PGRPs de la drosophile et les NODs de mammifères reconnaissent tous deux des sous-structures particulières du Peptidoglycane et ne présentent pas d'homologies structurales (revu dans (Ferrandon et al., 2004)).

Il n'y aurait donc pas de PRR conservé de façon universelle. En effet, à l'inverse des TLRs, Toll ne fonctionne pas comme un PRR, la famille GGBP/GRP est pratiquement absente chez les deutérostomiens et bien que la famille des PGRPs existe chez les mammifères, il n'y a aucune preuve à ce jour que ses membres fonctionnent comme des PRRs.

Le cas de Toll-9 est une exception: il est structurellement proche des TLRs et savoir s'il possède une fonction homologue à celle des TLRs, notamment s'il fonctionne comme un PRR ou non, nous apportera des informations précieuses sur la conservation des systèmes de reconnaissance du non-soi au cours de l'évolution.

**ARTICLES DE SYNTHÈSE RÉDIGÉS À
LA DEMANDE DE L'ÉDITEUR**

Toll Family Receptors

Hana Bilak, Servane Tauszig-Delamasure and Jean-Luc Imler,
in *Handbook of Cell Signaling, Elsevier Science*, Vol.2, Ch.179.
Edited by Bradshaw and Dennis, 2003

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

Toll Family Receptors

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

Handbook of Cell Signaling, Elsevier Science, 2003, vol. 2, Ch. 179, pages 333-337

Pages 333-337 :

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

Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*

Hana Bilak, Servane Tauszig-Delamasure and Jean-Luc Imler
Biochemical Society Transactions, 31, 648-651(2003)

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

Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*

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

Biochemical Society Transactions, 2003, vol. 31, part 3, pages 648-651

Pages 648-651 :

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akashi, S., Saitoh, S., Wakabayashi, Y., Kikuchi, T., Takamura, N., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Adachi, Y., *et al.* (2003). Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198, 1035-1042.
- 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.
- 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.
- 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.
- Beg, A. A. (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23, 509-512.
- 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.
- Ben-Neriah, Y. (2002). Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol* 3, 20-26.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40, 845-859.
- Bin, L. H., Xu, L. G., and Shu, H. B. (2003). TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem* 278, 24526-24532.
- 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.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23, 329-344.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.

- 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.
- Chen, P., Rodriguez, A., Erskine, R., Thach, T., and Abrams, J. M. (1998). Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in *Drosophila*. *Dev Biol* 201, 202-216.
- 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.
- Cornelie, S., Hoebeke, J., Schacht, A. M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M., and Riveau, G. (2004). Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J Biol Chem* 279, 15124-15129.
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J. F., Kohara, Y., and Ewbank, J. J. (2004). TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* 5, 488-494.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A., and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF ortholog Collier. *Public Library of Science in press*.
- 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 I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.

Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.

Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A., and Gay, N. J. (2003). Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 278, 41443-41451.

Edwards, D. N., Towb, P., and Wasserman, S. A. (1997). An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development* 124, 3855-3864.

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.

Ekegren, 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., Broeckeaert, 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., Imler, J. L., and Hoffmann, J. A. (2004). Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond. *Semin Immunol* 16, 43-53.

Ferrandon, D., Jung, A., Cricqui, 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.

Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adaptors TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-1055.

Gangloff, M., and Gay, N. J. (2004). MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends Biochem Sci* 29, 294-300.

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.

Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* 302, 2126-2130.

Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A., Reichhart, J. M., Belvin, M., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2004). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* by recognition of microbial patterns and sensing of virulence factors. *Cell submitted*.

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.

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., Kim, D. R., Weiss, L. A., Miller, J. W., and Morisato, D. (2003). Spatial regulation of developmental signaling by a serpin. *Dev Cell* 5, 945-950.

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.

Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C. L., and Goyert, S. M. (1996). Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4, 407-414.

Haziot, A., Lin, X. Y., Zhang, F., and Goyert, S. M. (1998). The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent. *J Immunol* 160, 2570-2572.

Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., and Hultmark, D. (1999). Relish, a Central Factor in the Control of Humoral but Not Cellular Immunity in *Drosophila*. *Molecular Cell* 4, 1-20.

- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.
- 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. [In Process Citation]. *Nature* 408, 740-745.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., *et al.* (2003a). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-748.
- Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J., and Beutler, B. (2003b). Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* 4, 1223-1229.
- Hornig, 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.
- Hornig, 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.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
- 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.
- Huttner, K. M., and Bevins, C. L. (1999). Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 45, 785-794.
- Imler, J. L., and Zheng, L. (2004). Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* 75, 18-26.
- 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.

Janeway, C. (1989). Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54, 1-13.

Kambris, Z., Hoffmann, J. A., Imler, J. L., and Capovilla, M. (2002). Tissue and stage-specific expression of the Tolls in *Drosophila* embryos. *Gene Expr Patterns* 2, 311-317.

Kaneko, T., Goldman, W. E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N. (2004). Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* 20, 637-649.

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.

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.

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.

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190-198.

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

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J., and Hoffmann, J. (1995a). A recessive mutation, immune

deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9365-9469.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1995b). 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.

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., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J. H., Caroff, M., Lee, W. J., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* 4, 478-484.

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.

Liberati, N. T., Fitzgerald, K. A., Kim, D. H., Feinbaum, R., Golenbock, D. T., and Ausubel, F. M. (2004). Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6593-6598.

- Ligoxygakis, P., Bulet, P., and Reichhart, J. M. (2002a). 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. (2002b). 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. (2002c). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *Embo J* 21, 6330-6337.
- Ligoxygakis, P., Roth, S., and Reichhart, J. M. (2003). A serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 13, 2097-2102.
- 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.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.
- Meister, M. (2004). Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16, 10-15.
- Meister, M., and Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 5, 573-580.
- 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.
- Miyake, K. (2004). Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 12, 186-192.
- 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.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3, 667-672.

- 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* 17(5), 575-581.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* 68, 450-456.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4, 423-430.
- O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A., and Bowie, A. G. (2003). The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24, 286-290.
- Onfelt Tingvall, T., Roos, E., and Engstrom, Y. (2001). The imd gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Rep* 2, 239-243.
- Ooi, J. Y., Yagi, Y., Hu, X., and Ip, Y. T. (2002). The *Drosophila* Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense. *EMBO Rep* 3, 82-87.
- 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- α induction. *Nature Immunol* 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.
- Pearson, A. M., Baksa, K., Ramet, M., Protas, M., McKee, M., Brown, D., and Ezekowitz, R. A. (2003). Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect* 5, 815-824.
- 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.
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2004). In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem* 279, 12848-12853.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M., 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.

- 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., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416, 644-648.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., and Ezekowitz, R. A. (2001). *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* 15, 1027-1038.
- Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H., and Raz, E. (2004). Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 172, 2739-2743.
- Reichhart, J., Georgel, P., Meister, M., Lemaitre, B., Kappler, C., and Hoffmann, J. (1993). Expression and nuclear translocation of the rel/NF- κ B-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila*. *CR Acad Sci (Paris)* 316, 1218-1224.
- Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 16, 27-34.
- Rose, D., Zhu, X., Kose, H., Hoang, B., Cho, J., and Chiba, A. (1997). Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in *Drosophila*. *Development* 124, 1561-1571.
- Royet, J. (2004). *Drosophila melanogaster* innate immunity: an emerging role for peptidoglycan recognition proteins in bacteria detection. *Cell Mol Life Sci* 61, 537-546.
- 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 γ 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.

Ryu, J. H., Nam, K. B., Oh, C. T., Nam, H. J., Kim, S. H., Yoon, J. H., Seong, J. K., Yoo, M. A., Jang, I. H., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2004). The homeobox gene *Caudal* regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila epithelia*. *Mol Cell Biol* 24, 172-185.

Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., *et al.* (2004). Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol* 16, 961-969.

Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y., and Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* 171, 417-425.

Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2, 947-950.

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429-1431.

Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1989). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations. *Genetics* 121, 101-117.

Sen, J., Goltz, J. S., Stevens, L., and Stein, D. (1998). Spatially restricted expression of pipe in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell* 95, 471-481.

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., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D., and Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* 14, 2461-2471.

- Söderhäll, K., and Cerenius, L. (1998). Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Op Immunol* 10, 23-28.
- Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., and Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO reports* 1, 347-352.
- Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T., and Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5991-5996.
- Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G., and Wasserman, S. A. (2002). A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12871-12876.
- Sun, H., Towb, P., Chiem, D. N., Foster, B. A., and Wasserman, S. A. (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *Embo J* 23, 100-110.
- Suzuki, N., Suzuki, S., and Yeh, W. (2002). IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol* 23, 503.
- 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., 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.
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10520-10525.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L., *et al.* (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* 36, 283-287.
- Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Barnes, P. F., Rollinghoff, M., Bolcskei, P. L., Wagner, M., *et al.* (2001). Induction of Direct Antimicrobial Activity Through Mammalian Toll-Like Receptors. *Science* 291, 1544-1547.

Thomma, B., and Broekaert, W. (1998). Tissue-specific expression of plant defensin genes *PDF2.1* and *PDF2.2* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 36, 533-537.

Tingvall, T. O., Roos, E., and Engstrom, Y. (2001). The GATA factor Serpent is required for the onset of the humoral immune response in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3884-3888.

Tobias, P. S., Soldau, K., Gegner, J. A., Mintz, D., and Ulevitch, R. J. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 270, 10482-10488.

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., 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.

Tzou, P., Reichhart, J. M., and Lemaitre, B. (2002). Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2152-2157.

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens [see comments]. *Nature* 401, 811-815.

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.

Uvell, H., and Engstrom, Y. (2003). Functional characterization of a novel promoter element required for an innate immune response in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 23, 8272-8281.

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 MAPKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* 15, 1900-1912.

Viriyakosol, S., Tobias, P. S., Kitchens, R. L., and Kirkland, T. N. (2001). MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276, 38044-38051.

Wagner, H. (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 25, 381-386.

- 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.
- Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J. L., and Gay, N. J. (2003). Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* 4, 794-800.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847.
- Williams, M., Rodriguez, A., Kimbrell, D., and Eldon, E. (1997). The *18-wheeler* mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J* 16, 6120-6130.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.
- Xiao, T., Towb, P., Wasserman, S. A., and Sprang, S. R. (1999). Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube. *Cell* 99, 545-555.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., *et al.* (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 1144-1150.
- 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.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.