

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

Domaine : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par

Jean Michel UBEDA

**Les cellules sanguines de drosophile:
Etude transcriptionnelle et analyse génétique de leur réponse à une
infection parasitaire**

Soutenue le 12 octobre 2005 devant la commission d'examen:

Mme Angela GIANGRANDE

(examinatrice, IGBMC, Illkirch)

M. Serge POTIER

(rapporteur interne, Institut de Botanique, Strasbourg)

M. Thierry JAFFREDO

(rapporteur externe, Laboratoire de Biologie du Développement, Paris)

Mme Marylène POIRIÉ

(rapporteur externe, UMR 1112 INRA, Nice)

Mme Marie MEISTER

(directrice de thèse, IBMC, Strasbourg)

-Remerciements-

J'exprime ma reconnaissance au Pr Jules Hoffmann pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, me donnant ainsi la chance de réaliser ce travail de thèse dans un environnement scientifique de grande qualité. Je le remercie pour m'avoir soutenu durant les premières années de mon doctorat.

Mes plus sincères remerciements à Mme Angela Giangrande, M. Serge Potier, M. Thierry Jaffredo et Mme Marylène Poirié, pour avoir accepté de me faire don d'une partie de leur temps pour lire et juger ce travail.

Tout particulièrement, je tiens à remercier Marie Meister pour m'avoir épaulé, guidé, et conseillé tout au long de mon doctorat. Je te remercie également pour ta disponibilité et ton aide au quotidien. Je suis content d'avoir pu effectuer ce travail à tes côtés, et d'avoir bénéficié de tes qualités scientifiques et humaines. Le hasard a voulu que je sois ton dernier étudiant, c'est dommage et je te souhaite bonne chance pour la suite.

Une grande partie de ce travail a pu exister grâce à une collaboration avec l'équipe d'Alain Vincent et Michèle Crozatier à Toulouse. Je les remercie personnellement pour cette interaction très enrichissante.

Quand on arrive en DEA, on a tout à apprendre et j'ai beaucoup appris avec le Dr Marie Lagueux, je la remercie chaleureusement pour avoir contribué à ma formation pratique. Je tiens aussi à remercier Daniel Doucet pour m'avoir appris toutes les "astuces" de la biologie moléculaire...

Ce rapport représente quatre ans de travail, je le voulais complet et clair. Je suis reconnaissant envers le Dr Jean-Luc Imler, mais aussi Vanessa et Catherine pour avoir lu ce rapport et pour m'avoir fait part de leurs critiques. Je remercie Cécile pour sa maîtrise de EndNote(6, pas plus).

Les années passées dans ce laboratoire m'ont permis de créer des liens et rencontrer des personnes formidables. Je pense particulièrement à Vanessa, merci pour ton oreille, ton amitié et ton soutien inconditionnel, ainsi qu'aux filles de notre "club très fermé" qui sont Cécile V., Cécile F. et Catherine, merci pour m'avoir ouvert les yeux... et m'avoir rendu cette dernière année si agréable!

Merci à Anne Braun pour ses conseils et à Richard pour sa bonne humeur dans l'équipe, merci à vous deux pour votre participation au projet "Latran".

Merci aux personnes qui m'ont facilité le travail au quotidien: Paule et Rachel, merci pour votre gentillesse, Sebahat et Marie-Eve, mes deux voisines de paillasse, merci pour votre aide.

Je suis heureux d'avoir pu profiter des conseils d'autres personnes au laboratoire au cours des labmeetings mais également à d'autres occasions: Dominique Ferrandon, Jean-Marc Reichhart, Vincent Leclerc, Jean-Luc Imler, Julien Royet, un grand merci à vous.

Je suis également reconnaissant envers les “anciens jeunes” et les “nouveaux jeunes” du laboratoire qui m’ont aidé à un moment donné: merci à Hana, Nadège, Vincent B., Jessica, Emmanuel, Anne-Isabelle, Nadine, Marie G., Francine et David.

Chacun a contribué à la vie du laboratoire et directement ou indirectement à mes travaux. Je ne vous nomme pas mais je vous remercie et vous souhaite à chacun bonne route.

Je remercie ma famille, mes parents, ainsi que mes frères et sœur qui ont toujours cru en moi et sans qui je ne serais jamais parvenu jusqu’ici.

-INTRODUCTION-	3
I. La réponse immunitaire de la drosophile	6
A. La réponse humorale aux infections bactériennes et fongiques	6
1. Les peptides antimicrobiens	6
2. Régulation des gènes codant les peptides antimicrobiens	7
3. Reconnaissance des microorganismes et activation des voies de régulation	10
B. Les réponses cellulaires des hémocytes et leurs fonctions	12
1. Les plasmotocytes et la phagocytose	13
2. Les cellules à cristaux et la mélanisation	15
3. Les lamellocytes et l'encapsulation	17
C. La coagulation	19
1. La coagulation chez la limule	19
2. La coagulation chez la drosophile	20
II. L'hématopoïèse chez la drosophile	21
A. Les processus hématopoïétiques	21
1. L'hématopoïèse chez l'embryon	21
2. L'hématopoïèse larvaire	22
3. La double origine ontogénique des hémocytes de la drosophile	23
B. La régulation génétique de l'hématopoïèse	24
1. Le facteur GATA Serpent	24
2. Les facteurs de lignage	25
3. La voie de signalisation Notch	28
4. Le récepteur PVR (PDGF-VEGF Receptor)	29
5. La voie JAK/STAT	31
6. La voie Toll	33
C. Comparaison des systèmes hématopoïétiques des mammifères et de la drosophile	33
1. Les facteurs GATA, FOG et Runx dans l'hématopoïèse des mammifères	34
2. Les facteurs à domaine Runt	35
3. La voie JAK/STAT	35
4. La voie Notch	36
5. Les voies Ras/Raf et VEGFR dans l'hématopoïèse des mammifères	37
III. Les interactions hôtes-parasitoïdes chez la drosophile	37
A. Le parasitisme chez les Insectes	37
B. Les Hyménoptères endoparasitoïdes et leurs hôtes	39
C. La relation hôte-parasitoïde <i>Drosophila melanogaster</i>-<i>Leptopilina boulardi</i>	40
IV. Objectif de ce travail	42
-RESULTATS-	44
CHAPITRE I <i>Analyse de l'activité transcriptionnelle des hémocytes de la drosophile</i>	45
I. Introduction	46
II. Article I <i>New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis.</i>	47
III. Résumé	49

IV. Discussion	51
CHAPITRE II <i>Etude du facteur Collier dans le développement hématopoïétique de la drosophile</i>	54
I. Introduction	55
II. Article II <i>Cellular Immune Response to Parasitization in Drosophila Requires the EBF Orthologue Collier</i>	56
III. Résumé	58
IV. Discussion	59
V. Objectifs <i>A la recherche des partenaires de Col</i>	63
CHAPITRE III <i>Les homologues des récepteurs IL-6R des mammifères dans l'hématopoïèse de la drosophile</i>	65
I. Introduction	66
A. Les récepteurs à cytokines de la famille IL-6R des mammifères	66
B. Les homologues des récepteurs IL-6R/gp130 chez la drosophile	68
II. Données préliminaires	69
A. Latran et Domeless, deux candidats pour le récepteur R2	69
B. Les approches transgéniques	70
III. Génération d'un mutant latran perte-de-fonction	72
A. Mutagenèse par mobilisation d'éléments P	72
1. Principe	72
2. Recherche d'éléments P proches de <i>latran</i>	73
3. Mobilisation de l'élément P par sauts locaux	73
4. Résultats	74
B. Invalidation du gène <i>latran</i> par recombinaison homologue	75
1. Le Knock-Out chez la souris	75
2. Application de cette technique chez la drosophile pour la délétion de <i>latran</i>	76
3. Fréquence des évènements de recombinaison	78
IV. Discussion et perspectives	78
-DISCUSSION GENERALE-	82
Références bibliographiques	84

Table des Figures

Figure 1: Schéma récapitulatif de la voie Toll dans le corps gras de drosophiles adultes	7
Figure 2: Schéma récapitulatif de la voie IMD dans le corps gras de drosophiles adultes	8
Figure 3: Le plasmatoocyte	13
Figure 4: La cellule à cristaux	15
Figure 5: La cascade de la mélanisation chez les arthropodes	16
Figure 6: Le lamellocyte	17
Figure 7: La coagulation chez la limule	19
Figure 8: Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire chez <i>Drosophila melanogaster</i>	21
Figure 9: La glande de la lymphe	22
Figure 10: Régulations génétiques de l'hématopoïèse chez la drosophile	24
Figure 11: Le parasitisme de <i>Drosophila melanogaster</i> par <i>Leptopilina boulardi</i>	40
Figure 12: Collier est l'orthologue de EBF chez la drosophile	55
Figure 13: Modèle de différenciation des lamellocytes suite à une infection parasitaire	59
Figure 14: Les récepteurs de la famille IL-6R des mammifères et leurs homologues chez la drosophile	66
Figure 15: La signalisation par les récepteurs de la famille IL-6R chez les mammifères	67
Figure 16: Expression de <i>latran</i> et <i>domeless</i> dans la glande de la lymphe	69
Figure 17: Les éléments P au voisinage de <i>latran</i> et la stratégie de PCR pour le criblage des lignées mutantes	73
Figure 18: Clonage du fragment donneur pour la recombinaison homologue	76
Figure 19: Délétion du gène <i>latran</i> par recombinaison homologue	77

-INTRODUCTION-

Tout organisme vivant est confronté en permanence à des pathogènes potentiels appartenant à plusieurs catégories (virus, bactéries, parasites, champignons...). Ces pathogènes peuvent l'envahir par différentes voies d'entrée : les voies respiratoires, le tractus digestif, la peau, et le sang à l'occasion des blessures. Lorsque les barrières physiques sont franchies, un système de défense complexe se met en place pour contenir l'invasion, le système immunitaire. On distingue classiquement dans le système immunitaire deux grands bras, celui de l'immunité «innée» et celui de l'immunité acquise dite «adaptative».

L'immunité innée est la première ligne de défense lors des infections, elle est efficace contre de nombreux microorganismes dont les constituants de surface communs sont restés constants au cours de l'évolution. Ces motifs moléculaires sont reconnus par des récepteurs invariables codés dans la lignée germinale, les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Cette reconnaissance, au sens large, des motifs microbiens a fait croire que cette immunité était non-spécifique vis-à-vis du pathogène. Suite aux infections, elle déclenche rapidement des mécanismes effecteurs comme la phagocytose et la production de peptides antimicrobiens. Les insectes, tels que la drosophile, qui ne bénéficient que de cette immunité innée, combattent pourtant les infections microbiennes et parasitaires de façon efficace.

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative, qui existe uniquement chez les vertébrés, a développé des récepteurs spécialisés d'une très grande variabilité, les anticorps et les récepteurs des lymphocytes T. Cette variabilité est causée par de nombreux réarrangements somatiques des gènes codant ces récepteurs. Les lymphocytes se sont spécialisés dans la production de ce vaste répertoire. Les lymphocytes diffèrent ainsi les uns des autres par la structure des récepteurs présents à leur surface. Un avantage déterminant de l'immunité adaptative est l'établissement d'une mémoire immunitaire, permettant de développer des réponses plus rapides et plus efficaces vis-à-vis des agresseurs microbiens lorsque les contacts se répètent. D'importants efforts ont été apportés ces dernières décennies pour l'étude des mécanismes des immunités innée et adaptative.

La drosophile est un organisme modèle largement utilisé pour la compréhension des processus biologiques. Son génome est entièrement séquencé (Adams et al., 2000) et de nombreux outils génétiques sont disponibles pour effectuer ces études. L'absence d'immunité adaptative chez la drosophile représente un avantage pour l'étude des mécanismes de l'immunité innée. En effet, ce modèle permet de s'affranchir des interactions entre les deux réponses immunitaires, qui peuvent compliquer l'analyse chez les mammifères. Les études réalisées chez la drosophile ont

contribué de façon importante à une meilleure compréhension du fonctionnement de la réponse innée.

Les investigations menées jusqu'ici se sont focalisées essentiellement sur la réponse humorale antibactérienne et antifongique, plus précisément sur les voies de signalisation qui contrôlent la synthèse des différents peptides antimicrobiens. Cette thématique est désormais relativement bien documentée. En revanche, nous ne disposons que de peu de données moléculaires concernant les facettes de la réponse cellulaire ou les fonctions des cellules sanguines.

L'équipe du Dr Marie Meister, que j'ai intégrée pour effectuer mon doctorat, s'intéresse précisément aux fonctions des cellules sanguines de la drosophile et à leur contribution aux mécanismes de l'immunité innée. Une partie de mon projet de thèse, en collaboration avec d'autres personnes au laboratoire, a consisté en une dissection des caractéristiques transcriptionnelles des cellules sanguines, ou hémocytes, de la drosophile. Nous avons analysé les activités transcriptionnelles des hémocytes dans différents contextes génétiques et suite à des infections bactériennes, par la technique des puces à ADN. En parallèle, mon projet de thèse principal fut de comprendre le processus d'encapsulation de parasites qui nécessite chez la drosophile l'induction et la prolifération d'hémocytes spécialisés, appelés lamellocytes. Mon travail a permis de démontrer le rôle indispensable du transactivateur Collier, unique orthologue de EBF (Early B-cell Factor) des mammifères, pour la spécification des lamellocytes suite à une infection parasitaire. Dans la suite de mon travail, je me suis intéressé à un gène jusque-là non caractérisé, qui code une protéine transmembranaire putative homologue des récepteurs IL-6R/gp130 des mammifères.

Dans la première partie de cette introduction, je vais présenter nos connaissances actuelles concernant les différentes facettes de la réponse immunitaire chez la drosophile. La deuxième partie sera consacrée aux cellules sanguines de la drosophile. Enfin, je présenterai quelques données bibliographiques sur la réponse antiparasitaire chez les insectes, et plus particulièrement chez la drosophile.

I. La réponse immunitaire de la drosophile

La cuticule de la drosophile et les epithelia de surface représentent une barrière physique efficace contre l'entrée de microorganismes dans la cavité générale, appelée hémocoèle chez l'insecte. A l'occasion d'une blessure, les microorganismes vont pénétrer dans l'hémocoèle, où se trouve l'hémolymphe qui est l'équivalent du sang des mammifères. Les microorganismes sont alors confrontés à plusieurs mécanismes défensifs. Très rapidement des cascades protéolytiques sont activées dans l'hémolymphe, elles aboutissent à la mélanisation, la coagulation et à la production de molécules signal (Hoffmann and Reichhart, 2002) Une réponse humorale est assurée par les cellules du corps gras (équivalent du foie des mammifères) qui synthétisent et libèrent dans l'hémolymphe des peptides antibactériens et/ou antifongiques à large spectre d'action. Les hémocytes sont impliqués dans une réponse cellulaire, ils permettent la phagocytose des microbes, l'encapsulation des parasites, et certains hémocytes participent aux réactions de mélanisation.

A. La réponse humorale aux infections bactériennes et fongiques

1. Les peptides antimicrobiens

La drosophile dispose de plusieurs peptides antimicrobiens, qui ont pour caractéristique commune de posséder une alternance de parties cationiques et hydrophobes. On pense en général que la partie cationique leur permet de se fixer aux têtes polaires des phospholipides des membranes bactériennes, lesquelles sont chargées négativement contrairement à celles des cellules eucaryotes. Les parties hydrophobes permettent ensuite leur insertion dans la membrane cellulaire d'une large palette de bactéries, la déstabilisant et entraînant la lyse par entrée d'eau.

Sept familles différentes de peptides antimicrobiens ont été caractérisées chez la drosophile (Meister et al., 2000) Elles peuvent être assemblées en trois groupes qui se distinguent par leur spectre d'action. Les Défensines constituent un exemple de peptides antibactériens particulièrement actifs contre les bactéries à Gram positif. La Drosomycine et la Metchnikowine sont des peptides antifongiques, alors que les peptides Diptéricine, Attacine, Cécropine, et Drosocine sont principalement actifs contre les bactéries à Gram négatif.

2. Régulation des gènes codant les peptides antimicrobiens

La drosophile semble adapter la production des peptides antimicrobiens au type de microorganisme qui l'infecte. En effet, une infection naturelle par des champignons entomopathogènes induit l'expression des peptides antifongiques Drosomycine et Metchnikowine, et n'induit pas l'expression des peptides antibactériens. L'expression des peptides antibactériens, comme la Diptéricine, est quant à elle activée préférentiellement par des infections à Gram négatif (Lemaitre et al., 1997).

Il est maintenant clairement établi que cette induction différentielle des différents peptides antimicrobiens dans les cellules du corps gras est régulée au niveau génétique par deux voies de signalisation de type NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), les voies Toll et IMD (Hoffmann et al., 1999). La synthèse des peptides appropriés en réponse à une infection reflète l'activation sélective de l'une de ces deux voies de signalisation. Schématiquement, la voie Toll est activée suite à des infections fongiques et par des bactéries à Gram positif, alors que la voie IMD est activée par des bactéries à Gram négatif.

a. La voie Toll

La voie de transduction Toll fut caractérisée chez la drosophile pour son rôle au cours de l'embryogenèse où elle contrôle la mise en place de l'axe dorso-ventral (revue dans (Belvin and Anderson, 1996). Cette voie porte le nom du récepteur transmembranaire Toll, qui est le premier maillon de la voie de signalisation intracellulaire (Figure 1). En aval de *Toll*, quatre gènes furent identifiés : *tube*, *pelle*, *cactus* et *dorsal*. Les travaux menés par Lemaitre et al. (Lemaitre et al., 1996a) ont démontré que certains composants de cette voie de signalisation, plus précisément *Toll*, *tube*, *pelle* et *cactus*, sont réutilisés pour la réponse immunitaire chez l'adulte. Depuis, d'autres composants de la voie *Toll* ont été identifiés pour leur rôle dans ce processus : *MyD88* (Tauszig-Delamasure et al., 2002), qui est également utilisé chez l'embryon pour l'organisation de l'axe dorso-ventral, et *Dif* (*Dorsal-related immune factor*), qui est spécifique de la réponse immunitaire (Ip et al., 1993; Meng et al., 1999; Rutschmann et al., 2000a).

Le domaine extracellulaire du récepteur Toll présente des répétitions riches en leucine et son domaine intracytoplasmique présente des similarités avec celui du récepteur de l'interleukine-1 (domaine TIR pour Toll- IL 1- Receptor). Ce domaine TIR interagit avec un complexe adaptateur composé de MyD88, Tube et Pelle (Sun et al., 2002). Ces trois protéines interagissent entre elles par l'intermédiaire de leur «Death Domain» (DD). En plus de son DD, MyD88 possède un

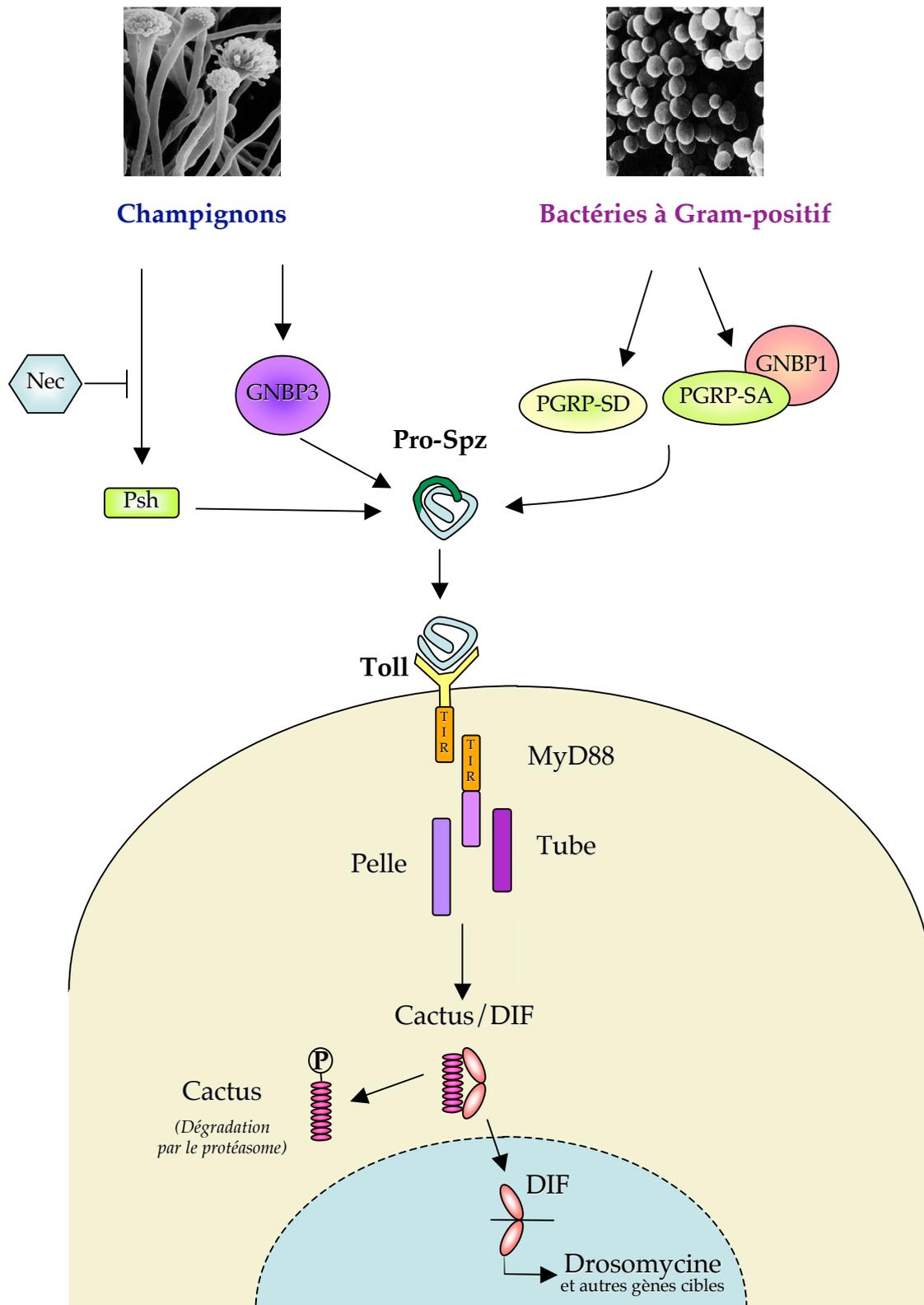


Figure 1 : Schéma récapitulatif de la voie Toll dans le corps gras de drosophiles adultes. La voie Toll est activée suite à une infection par des champignons ou des bactéries à Gram positif (voir texte pour les détails)

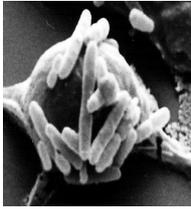
domaine TIR qui lui permet d'interagir avec le récepteur Toll. L'activation de la voie Toll lors d'une infection microbienne conduit à la phosphorylation puis à la dégradation de l'inhibiteur Cactus, un homologue de I- κ B (Inhibitor of NF- κ B). La kinase impliquée dans ce phénomène n'a pas encore été identifiée. Cactus est complexé dans le cytoplasme à un facteur de transcription de la famille Rel. Sa dégradation permet ainsi la libération du transactivateur et son transport dans le noyau où il va réguler l'expression de gènes cibles. Pour l'organisation de l'axe dorso-ventral chez l'embryon, le facteur de transcription impliqué dans la voie Toll est Dorsal. Cependant chez l'adulte, la voie Toll va mobiliser un autre facteur de la famille Rel pour activer les gènes des effecteurs de la réponse immunitaire, il s'agit de DIF. Chez la larve, DIF et Dorsal ont des fonctions redondantes pour la réponse immunitaire mais chez l'adulte, seul DIF contrôle l'expression des peptides antimicrobiens (Ip et al., 1993; Manfrulli et al., 1999; Rutschmann et al., 2000b).

L'analyse de l'induction des peptides antimicrobiens chez des mutants perte-de-fonction de cette voie ont permis de démontrer que la voie Toll joue un rôle important dans la résistance aux infections par des bactéries à Gram positif et par les champignons. De ce fait, les mutants perte-de-fonction de la voie Toll sont très sensibles à ces types d'infections, et présentent une survie réduite (Lemaitre et al., 1997; Rutschmann et al., 2002; Tauszig-Delamasure et al., 2002). En revanche, ils ne sont pas sensibles aux infections par des bactéries à Gram négatif et expriment normalement les peptides antibactériens comme la Diptéricine, apportant la preuve qu'au moins une autre voie est impliquée dans la réponse à ces microorganismes.

b. La voie IMD

L'identification d'une mutation appelée *immune deficiency (imd)* apporta la démonstration de l'existence de cette deuxième voie de transduction (Figure 2). Cette voie IMD dirige les réactions de défense contre les bactéries à Gram négatif (Lemaitre et al., 1995), et contrôle l'expression des peptides antibactériens Diptéricine, Cécropine, Drosocine et Attacine.

Comme pour la voie Toll, l'induction de l'expression des gènes qui codent ces peptides antibactériens est placée sous le contrôle transcriptionnel d'un transactivateur de la famille Rel κ Relish. Relish n'est pas séquestré dans le cytoplasme par liaison à un inhibiteur de type I- κ B, mais par la présence dans sa région C-terminale de domaines ankyrine qui le maintiennent dans le cytoplasme. Son activation nécessite une coupure protéolytique pour libérer la région N-terminale,



Bactéries à Gram-négatif

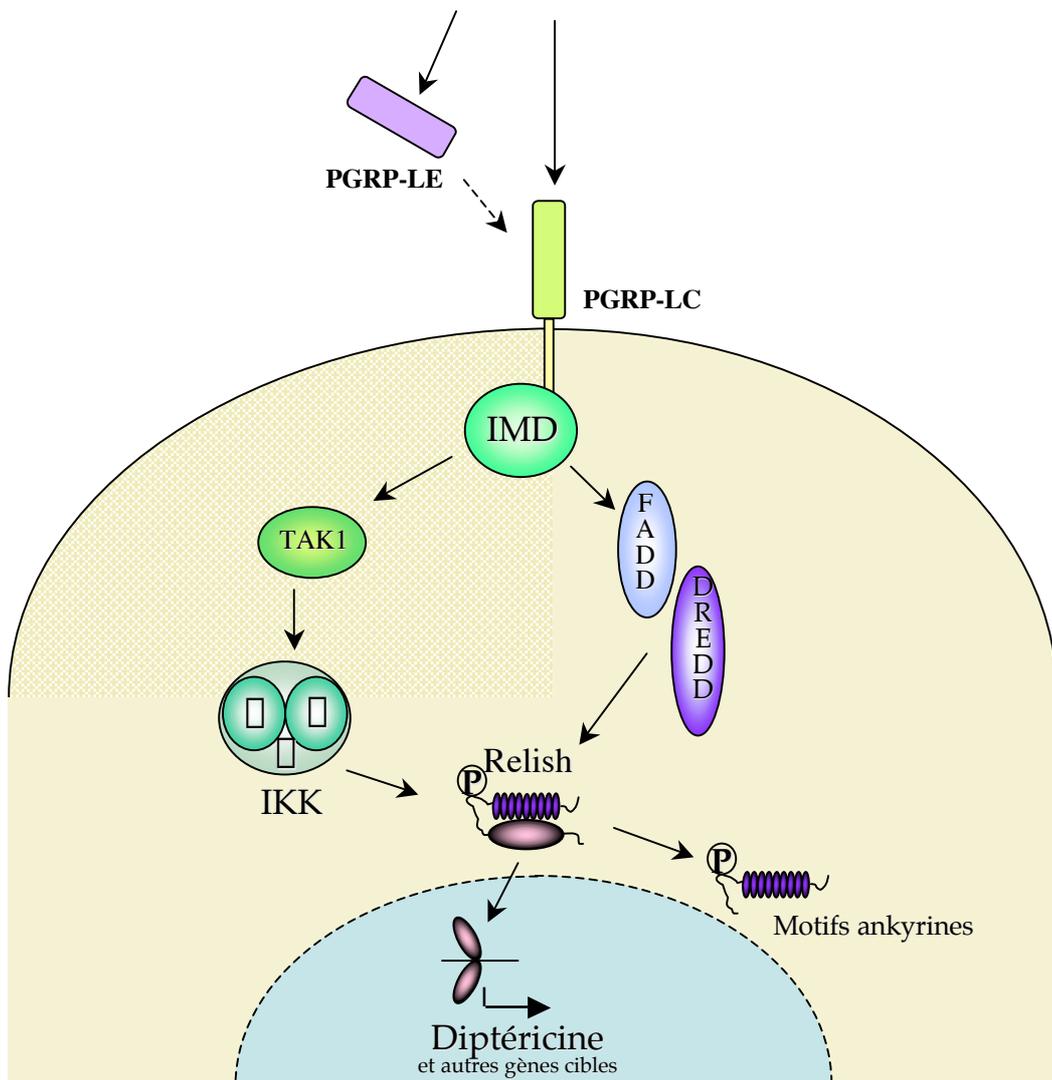


Figure 2 : Schéma récapitulatif de la voie IMD dans le corps gras de drosophiles adultes. La voie IMD est activée suite à une infection par les bactéries à Gram négatif (voir texte pour les détails).

qui contient le domaine Rel, et permettre sa translocation dans le noyau où il va réguler la transcription de gènes cibles (Dushay et al., 1996; Hedengren et al., 1999; Stoven et al., 2000).

Un récepteur transmembranaire de la voie IMD a été récemment identifié, PGRP-LC (Peptidoglycan Recognition Protein-LC), qui est capable de reconnaître et de fixer le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002b). Cependant, des données expérimentales suggèrent que PGRP-LC n'est pas le seul récepteur capable de détecter les bactéries à Gram négatif, il agirait en coopération avec d'autres récepteurs ou co-récepteurs. Des informations nous indiquent que PGRP-LE pourrait être un partenaire de PGRP-LC dans ces mécanismes de reconnaissance (Takehana et al., 2002; Takehana et al., 2004).

Le récepteur PGRP-LC active la voie IMD en interagissant directement avec IMD (Choe et al., 2005). Une ramification de la voie se produit en aval de IMD pour activer deux branchements. D'une part, IMD est impliqué dans un complexe adaptateur où il interagit avec deux autres protéines à domaine DD \square FADD et DREDD, un homologue de la caspase-8 des mammifères (Hu and Yang, 2000; Leulier et al., 2000; Leulier et al., 2002; Naitza et al., 2002). D'autre part, en aval de IMD, on retrouve une kinase homologue de TAK1 (Transforming growth factor- \square Activated Kinase 1) (Vidal et al., 2001), qui active un équivalent du signalosome des mammifères. Ce signalosome regroupe les homologues de IKK \square et IKK \square (I- \square B Kinase \square et \square), codés respectivement par les gènes *ird5* et *kenny* (Lu et al., 2001; Rutschmann et al., 2000c; Silverman et al., 2000). Les actions conjuguées du complexe IKK et de la caspase DREDD sont responsables de la coupure protéolytique qui active Relish (Stoven et al., 2003) et de l'expression des peptides antibactériens.

Les mutants perte-de-fonction de la voie IMD sont sensibles aux infections par les bactéries à Gram négatif, et ils présentent une expression fortement réduite des peptides antibactériens. En revanche, ils ne sont pas sensibles aux infections fongiques, ni aux infections par les bactéries à Gram positif. Ces mutants ne sont pas affectés dans la synthèse des peptides exclusivement contrôlés par la voie Toll, comme la Drosomycine et la Metchnikovine. Le fait que le double mutant *imd \square Toll* ne soit plus capable de produire les peptides antimicrobiens (Lemaitre et al., 1995) confirme que la régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens dépend uniquement des deux voies de signalisation intracellulaires Toll et IMD.

3. Reconnaissance des microorganismes et activation des voies de régulation

a. Activation de la voie Toll par des cascades protéolytiques

Chez l'embryon, Toll est activé par Spätzle (Spz), une protéine sécrétée proche des facteurs de croissance des mammifères, qui doit subir une coupure protéolytique pour se lier au récepteur Toll (DeLotto and DeLotto, 1998; Mizuguchi et al., 1998; Weber et al., 2005; Weber et al., 2003). Spz est également impliquée, chez l'adulte, dans l'activation de la voie Toll au cours de la réponse immunitaire (Lemaitre et al., 1996b) (Figure 1). La cascade protéolytique activatrice de la voie Toll chez l'embryon n'est pas utilisée chez l'adulte pour la réponse immunitaire. La coupure de Spz, après une infection, est ainsi sous le contrôle d'autres protéases dont la plupart sont encore inconnues.

L'implication d'une cascade protéolytique pour l'activation de la voie Toll fut suggérée avec la découverte qu'un inhibiteur de protéase à sérine (serpine), appelé Necrotic (Nec), contrôle la coupure de Spz (Figure 1). La mutation perte-de-fonction *nec* provoque une coupure constitutive de Spz et l'expression du gène codant la Drosomycine en absence de stimuli immun (Levashina et al., 1999). Depuis, une protéase à sérine impliquée dans cette voie a été isolée: la protéase Perséphone (Psh) (Ligoxygakis et al., 2002a). La serpine Nec contrôle de façon négative la cascade protéolytique qui coupe Spz en agissant probablement sur Psh. De manière surprenante, les mutants *psh* se comportent comme des mutants classiques de la voie Toll suite à des infections par les champignons, alors qu'ils sont résistants et produisent de la Drosomycine après infection par les bactéries à Gram positif. Ces résultats mettent en évidence qu'au moins deux cascades contrôlent l'activation de la voie Toll au cours de la réponse immunitaire: l'une est activée par les champignons et implique la protéase Psh et la serpine Nec, l'autre est activée par les bactéries à Gram positif. Une question capitale est de comprendre les mécanismes de reconnaissance qui permettent au système immunitaire de la drosophile de différencier les microorganismes et d'activer la voie adéquate.

b. Les molécules de reconnaissance: la famille des PGRPs et des GNBPs

Nos connaissances actuelles font état de deux familles de molécules responsables de l'initiation de la réponse immunitaire. Ces molécules appartiennent aux familles des PGRPs et des GNBPs/βGRPs (Gram Negative Binding Proteins/β-Glucan Recognition Proteins).

Les protéines PGRPs ont été isolées pour la première fois chez les Lépidoptères pour leur capacité à fixer le peptidoglycane (Yoshida et al., 1996), un composant de la paroi des bactéries. Ce peptidoglycane est présent dans la paroi interne des bactéries à Gram négatif, mais il est particulièrement abondant et disponible au niveau de la couche externe des bactéries à Gram positif. Des protéines PGRPs ont par la suite été identifiées chez d'autres espèces d'invertébrés, mais également chez les vertébrés, mettant en évidence leur conservation au cours de l'évolution (Kang et al., 1998). Le génome de la drosophile contient 13 gènes codant des PGRPs, six d'entre eux codent des formes PGRP-S (S pour Small) et sept codent des PGRP-L (Long) (Werner et al., 2000). Les formes S sont de petites molécules circulantes, alors que les formes L, de taille supérieure, sont pour la plupart potentiellement transmembranaires.

La première étude *in vivo* consacrée aux rôles des PGRPs dans la réponse immunitaire a confirmé l'existence d'une deuxième voie d'activation de la voie Toll, par les bactéries à Gram positif, indépendamment du couple Nec/Psh (Figure 1). Cette étude était basée sur l'isolement de la mutation *semmelweiss* (*seml*) et l'identification du gène correspondant \square PGRP-SA. Les drosophiles mutantes *seml* se sont révélées sensibles aux infections par les bactéries à Gram positif, et sont incapables d'activer la voie Toll suite à cette infection. En revanche, l'activation de la voie Toll par les champignons reste normale chez ces mutants. PGRP-SA est une protéine soluble, circulant dans l'hémolymphe, capable de reconnaître le peptidoglycane des bactéries à Gram positif, et d'initier une voie de signalisation aboutissant à l'activation de Toll (Michel et al., 2001).

Des études biochimiques ont conduit à l'identification d'une deuxième famille de protéines chez les Lépidoptères. Elles présentent la particularité de fixer *in vitro* les bactéries à Gram négatif ainsi que le \square (1-3)glucane, un composant de la paroi des champignons (Kim et al., 2000). Ces protéines ont été regroupées sous le nom de GNBP/GRPs. Le génome de la drosophile code trois protéines de cette famille, *GNBP1, 2 et 3*.

Des résultats inattendus furent obtenus avec l'observation que le mutant perte-de-fonction *GNBP1*, appelé *osiris* (*GNBP^{osi}*), se comportait de façon identique au mutant *PGRP-SA^{seml}*. Des études complémentaires ont mis en évidence que ces deux protéines agissent en synergie en formant un complexe PGRP-SA/GNBP1 en circulation (Figure 1). Ce complexe est nécessaire à l'activation de la cascade conduisant à la coupure de Spz et au déclenchement de la réponse immunitaire (Gobert et al., 2003; Pili-Floury et al., 2004).

Simultanément, des études ont révélé que certaines bactéries à Gram positif peuvent activer la voie Toll indépendamment du complexe PGRP-SA/GNBP1, suggérant une redondance fonctionnelle et l'existence de récepteurs alternatifs. Ainsi, le rôle de PGRP-SD comme récepteur de certaines bactéries à Gram positif, telles que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* ou *Streptococcus pyogenes* a pu être établi (Bischoff et al., 2004).

Le rôle de GNBP3 a été étudié suite à l'obtention d'un mutant appelé *hades*. Ce mutant perte-de-fonction présente une grande sensibilité aux infections par les champignons. GNBP3 est engagé, en amont du récepteur Toll, dans l'activation de la réponse antifongique en définissant une voie parallèle à Psh (Gottar et al., soumis) (Figure 1). Deux voies indépendantes semblent ainsi contrôler l'activation de la voie Toll suite à une infection fongique : la première requiert Psh et pourrait être activée par des protéases ou des facteurs de virulence sécrétés par les champignons. La deuxième est initiée par GNBP3 qui reconnaît des constituants de la membrane des champignons.

B. Les réponses cellulaires : les hémocytes et leurs fonctions

Les insectes possèdent un système circulatoire ouvert. L'ensemble des organes et des hémocytes baigne dans l'hémolymphe et le brassage est assuré par un organe pulsatile : le vaisseau dorsal, ouvert à ses deux extrémités.

Chez les vertébrés, le transport de l'oxygène est assuré par les érythrocytes. Les insectes ont une respiration trachéenne : l'oxygène est transporté directement aux cellules par le système trachéen qui présente de très nombreuses ramifications. Les hémocytes ne sont donc pas impliqués dans ce processus.

Les différents ordres d'insectes présentent des populations d'hémocytes qui sont très hétérogènes. Ces différentes populations peuvent néanmoins être regroupées autour de plusieurs archétypes ayant des fonctions précises. De façon générale, les insectes sont dotés de cellules phagocytaires, le plus souvent appelées cellules granulocytes, des cellules dédiées aux fonctions d'encapsulation, et des cellules responsables des réactions de mélanisation. Ces trois types cellulaires ne sont pas uniques, des variantes existent chez certaines espèces. Certains hémocytes se rapprochent de la lignée myéloïde des mammifères, et il n'existe chez les arthropodes aucune cellule sanguine comparable aux lignées lymphoïdes.

La première description des cellules sanguines de *Drosophila melanogaster* fut réalisée par Rizki et ses collaborateurs (revue dans (Rizki, 1978; Rizki and Rizki, 1984) à partir de cellules isolées de l'hémolymphe et sur des coupes histologiques de larves et d'adultes. Ces auteurs ont décrit trois types de cellules sanguines : les plasmatoctes, les cellules à cristaux et les lamellocytes.

1. Les plasmatoctes et la phagocytose

a. Description

Les plasmatoctes sont des cellules de 10 à 15 μm de diamètre, représentant plus de 90% de la population des hémocytes circulants chez la larve. Ils sont le seul type hémocytaire présent chez l'adulte. Les plasmatoctes peuvent s'apparenter aussi bien d'un point de vue fonctionnel que structural aux monocytes/macrophages des mammifères. Les plasmatoctes sont les phagocytes professionnels : ce sont les seuls hémocytes capables de phagocytose chez la drosophile .

L'examen de ces cellules au microscope électronique à transmission (Figure 3A) permet de constater la présence dans le cytoplasme de nombreux lysosomes, de phagosomes, et de corps de résorption, ce qui traduit une activité phagocytaire importante. Les plasmatoctes vont assurer la phagocytose des cellules apoptotiques et des tissus histolysés au cours du développement (Franc et al., 1996; Franc et al., 1999; Lanot et al., 2001). Ces phagocytes sont des acteurs importants dans le remodelage des tissus au cours du développement, d'autant plus qu'ils présentent également des caractéristiques d'une synthèse protéique intense. Des études ont montré qu'ils synthétisent des protéines structurales de la matrice extracellulaire qui entoure les organes, comme le collagène et la Peroxydase (Fessler et al., 1994). Les plasmatoctes contribuent également aux défenses immunitaires suite à une infection, par la phagocytose des agents infectieux (Figure 3B).

b. La phagocytose des cellules apoptotiques

Pour jouer leur rôle de phagocytes, les plasmatoctes doivent être en mesure de reconnaître les cellules en apoptose ainsi que les microorganismes à détruire afin de permettre une «clearance», selon le terme consacré en anglais, du milieu environnant.

En ce qui concerne l'apoptose, cette reconnaissance requiert la participation, d'une part, de la cellule en apoptose, qui doit exhiber des signaux de mort et, d'autre part, des macrophages, qui doivent être en mesure de les interpréter efficacement. Deux récepteurs ont été identifiés pour leur

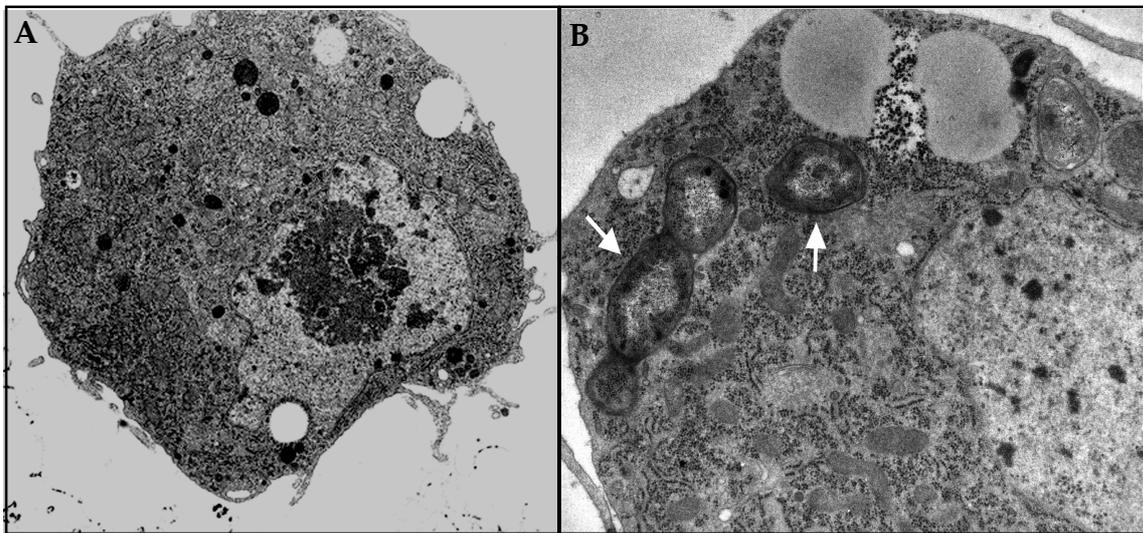


Figure 3 : Le plasmatocyte. A) un plasmatocyte observé au microscope électronique à transmission (MET). Les plasmatocytes de drosophile présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles équivalentes aux monocytes/macrophages de mammifères. B) l'analyse au MET révèle la présence de nombreux phagosomes (flèches blanches) renfermant des bactéries, dans le cytoplasme des plasmatocytes, ce qui témoigne de leur activité phagocytaire.

rôle dans la phagocytose des corps apoptotiques chez la drosophile. Le premier récepteur identifié est un homologue de CD36 des mammifères, appelé Croquemort (Franc et al., 1996; Franc et al., 1999). Ce récepteur est indispensable pour la reconnaissance des corps apoptotiques et pour leur ingestion par les plasmotocytes au cours de l'embryogenèse. Des travaux récents ont dévoilé l'existence d'un deuxième mécanisme de phagocytose, indépendant de Croquemort, et responsable de la phagocytose d'une partie des cellules apoptotiques chez l'embryon. Ce mécanisme fait appel au récepteur Draper, un homologue de CED-1 de *C. elegans* (Manaka et al., 2004). Chez ce nématode, CED-1 est le récepteur de l'une des deux voies dirigeant la phagocytose des corps apoptotiques.

c. La phagocytose des bactéries

A l'heure actuelle, nous connaissons trois récepteurs phagocytaires à la surface des plasmotocytes capables de reconnaître et de promouvoir l'ingestion des bactéries : dSR-CI, PGRP-LC, et Eater.

dSR-CI est un récepteur scavenger proche des récepteurs scavenger de classe A des mammifères (Pearson et al., 1995), son expression est restreinte aux macrophages au cours du développement de la drosophile. dSR-CI présente une grande affinité pour des ligands anioniques de grande taille (tel que le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif). Des études *in vitro* ont montré que dSR-CI est un récepteur commun pour les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Ramet et al., 2001).

J'ai décrit plus haut PGRP-LC, un récepteur de la voie IMD dans les cellules du corps gras. Cependant, PGRP-LC fut identifié comme un récepteur phagocytaire qui promeut la phagocytose des bactéries à Gram négatif (Ramet et al., 2002b). En absence de PGRP-LC, les cellules S2 présentent des capacités de phagocytose légèrement réduites envers les bactéries à Gram négatif.

Eater est une protéine transmembranaire avec une région extracellulaire présentant des domaines de type Epidermal Growth Factor. Cette protéine fut identifiée récemment comme un récepteur majeur pour la phagocytose des bactéries. Des tests *in vivo* ont montré que l'efficacité de phagocytose des bactéries *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif) par les plasmotocytes de larves mutantes *eater* était fortement diminuée (Kocks et al., 2005).

Chez les mammifères, de nombreux microorganismes ne sont pas reconnus directement par les macrophages. La phagocytose est rendue possible par l'opsonisation, un procédé qui nécessite

le dépôt, à la surface des microorganismes, de molécules d'opsonines. Les opsonines facilitent l'attachement des cellules phagocytaires aux microorganismes. Les opsonines sont diverses, et parmi elles la protéine C3 du complément est un puissant facteur d'opsonisation. Des études ont rapporté des exemples d'opsonisation chez les insectes, et six gènes codant des protéines présentant de nombreuses similitudes avec les protéines de la famille du complément C3/ α 2-macroglobuline ont été découvertes (Lagueux et al., 2000). Ces protéines, appelées TEP (ThioEster-containing Proteins) possèdent toutes un peptide signal, suggérant qu'elles sont sécrétées. Aucune étude n'a pour le moment démontré une implication de ces protéines TEP dans la phagocytose de microorganismes chez la drosophile. Cependant, une étude menée chez le moustique *Anopheles gambiae*, a permis à Levashina et collaborateurs d'isoler des gènes codant des protéines homologues et de prouver que ces molécules agissent en tant qu'opsonines pour promouvoir la phagocytose des bactéries à Gram négatif (Levashina et al., 2001).

2. Les cellules à cristaux et la mélanisation

a. Description

Ces cellules apparaissent au stade embryonnaire, et sont plus tard retrouvées en circulation chez la larve. Elles représentent alors environ 5% des hémocytes. Cette population disparaît au cours de la métamorphose, et chez les adultes, les cellules à cristaux ne sont plus présentes (Lanot et al., 2001). Les cellules à cristaux doivent leur nom à la présence, dans leur cytoplasme, d'importantes inclusions cristallines, non enveloppées par une membrane (Figure 4). Ces inclusions sont supposées correspondre aux enzymes et aux substrats nécessaires à la mélanisation. Pour permettre la mélanisation, ces cellules se lysent et libèrent dans l'hémolymphe les enzymes inactives sous formes de zymogènes qui peuvent alors être activés.

b. La mélanisation chez les insectes

La production de mélanine intervient directement ou indirectement dans les mécanismes de défense des arthropodes. D'une part, au cours du développement, la cuticule est mélanisée, ce qui participe au tannage et au durcissement de cette enveloppe, renforçant son rôle protecteur. D'autre part, en cas de lésions cuticulaires, une pigmentation apparaît au niveau de la blessure, suggérant le lien entre la mélanisation et la cicatrisation. Enfin, la mélanisation est aussi un processus de

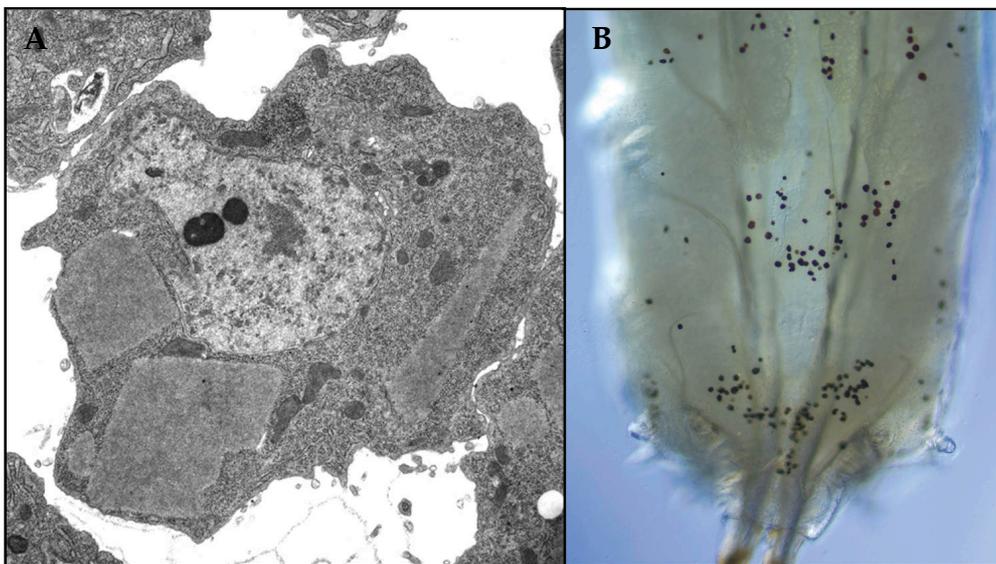


Figure 4 : La cellule à cristaux A) Photographie au MET d'une cellule à cristaux. Ces cellules se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de larges inclusions cristallines. Ces cristaux renferment les enzymes et probablement les substrats de la mélanisation, telle que la Prophénoloxydase. B) Les cellules à cristaux peuvent être observées, *in vivo*, chez des larves ayant subi au préalable un traitement à la chaleur de 10 minutes à 60°C. Ce traitement active vraisemblablement les enzymes de la mélanisation et entraîne le noircissement spécifique des cellules à cristaux, qui sont alors visibles à travers la cuticule.

défense humorale, elle s'effectue à la surface des parasites et des microbes infectieux (Carton and Nappi, 1997).

La cascade de mélanisation est initiée suite à une infection, par la reconnaissance de motifs microbien: le β (1-3)glucane des champignons et le peptidoglycane des bactéries (Ashida and Brey, 1997). Ces motifs microbiens sont détectés par des molécules de reconnaissance, comme les PGRPs et les GNBPs. Les molécules de reconnaissance activent ensuite une cascade protéolytique qui aboutit à l'activation de l'enzyme clef de la biosynthèse de la mélanine—la phénoloxydase (PO). Cette enzyme est une oxydoréductase qui est synthétisée et sécrétée sous forme d'un précurseur inactif, appelé prophénoloxydase (proPO) (Figure 5). Les proPOs sont activées par une coupure protéolytique au niveau de la séquence N-terminale, cette coupure est assurée par une protéase à sérine appelée PPAE (ProPhenoxidase Activating Enzyme). Un modèle général de la synthèse de la mélanine chez les insectes implique une suite de réactions biochimiques dont le substrat initial est la tyrosine ((Christensen et al., 2005). La PO activée catalyse l'oxydation de phénols en quinones, qui vont ensuite polymériser de façon non enzymatique pour former la mélanine (Nappi and Vass, 1993).

Les différentes étapes de la mélanisation génèrent un certain nombre de composés actifs (quinones, radicaux libres, anions superoxydes, peroxyde d'hydrogène...) hautement toxiques pour les microorganismes et l'hôte. Ces molécules modifient le pH et réagissent dans des réactions d'oxydo-réduction. Elles peuvent se lier de façon covalente avec les membranes cellulaires du parasite, provoquant la dépolymérisation des lipides et la dénaturation des enzymes. Afin d'éviter des effets délétères sur les cellules de l'hôte, il est impératif de contenir l'activité des phénoloxydases au site de blessure ou d'infection. La mélanisation est maintenue à un niveau local grâce à l'activité d'inhibiteurs de protéases, de type serpine, qui empêchent l'amplification des cascades protéolytiques.

c. La mélanisation chez la drosophile

Le génome de la drosophile contient trois gènes codant des proPOs—*proPO45* (CG8193), *proPO54* (CG5779 ou *DoxA1*) et *proPO59* (CG2952 ou *DoxA3*) (Fujimoto et al., 1995). Peu de choses sont connues sur l'expression de ces trois gènes. Nous savons que des proPOs sont présentes dans les cellules à cristaux mais nous ne savons pas lesquelles. Néanmoins, d'autres tissus sont capables de produire au moins une de ces enzymes puisque la *proPO54* est retrouvée

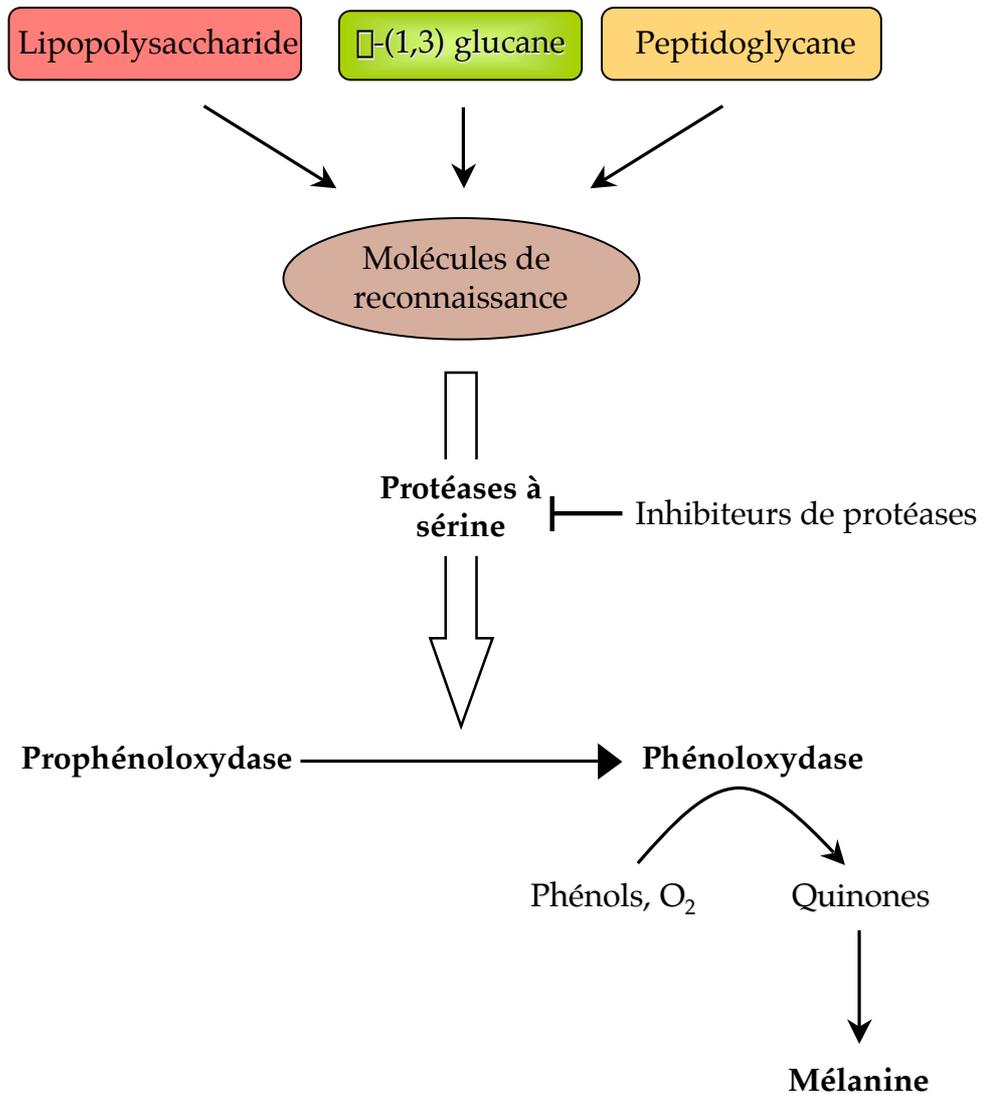


Figure 5 : La cascade de la mélanisation chez les arthropodes. (Représentation simplifiée). La reconnaissance de motifs microbiens permet de déclencher la cascade d'activation de la phénoloxydase. Cette cascade aboutit à la synthèse de la mélanine, un polymère de quinones.

D'après Söderhall & Cerenius, 1998

dans l'hémolymph de mouches adultes (Levy et al., 2004), alors qu'aucune cellule à cristaux n'existe à ce stade (Lanot et al., 2001).

Les différents éléments de la cascade protéolytique qui active les proPOs chez la drosophile ne sont pas bien connus. Les seuls travaux publiés concernent une molécule inhibitrice la serpine27A (Spn27A) (De Gregorio et al., 2002a; Ligoxygakis et al., 2002b). Cette serpine contrôle l'activation de la PO chez la drosophile en inhibant la cascade protéolytique en absence d'infection. L'identification de cette serpine nous indique qu'au moins une protéase à sérine est impliquée dans l'activation de cette enzyme chez la drosophile. Des travaux récents ont permis d'identifier une protéase de type PPAAE de la cascade protéolytique, codée par le gène *CG3066* et appelée *PAEI* (N. Pelte, communications personnelles).

La mutation *Black cell (Bc)* (Rizki et al., 1980) entraîne la mort et le noircissement des cellules à cristaux, avant qu'elles n'achèvent leur processus de différenciation (Braun et al., 1998; De Gregorio et al., 2002a). Cependant, la mutation *Bc* n'est pas caractérisée et les mutants *Bc* ne présentent aucune activité phénoloxidasique dans leur hémolymph. Ces mutants ne sont pas capables de produire de mélanisation humorale, et meurent «à l'hémorragie» lorsque la blessure est trop importante (Ramet et al., 2002a).

3. Les lamellocytes et l'encapsulation

a. Description

Les lamellocytes sont des cellules de grande taille (40 à 50 μ m de diamètre) et de forme aplatie (Figure 6A,B). L'observation de ces cellules au microscope électronique à transmission permet d'observer un cytoplasme relativement clair renfermant peu d'organites à l'exception de nombreux ribosomes à l'état libre (Lanot et al., 2001). Il a été longtemps proposé, à partir des travaux de Rizki et collaborateurs que ces cellules étaient des plasmatoctes à une étape ultérieure de différenciation (Rizki and Rizki, 1984). Les auteurs ont décrit des plasmatoctes dotés de pseudopodes qu'ils ont nommé podocytes ils ont proposé que ces podocytes représentent un état de différenciation intermédiaire entre plasmatoctes et lamellocytes. Cependant, Lanot et collaborateurs (2001) ont démontré que les lamellocytes correspondent à un lignage différent. Les lamellocytes se différencient indépendamment à partir de précurseurs indifférenciés, appelés prohémoctes, dans la glande de la lymphe qui est l'organe hématopoïétique larvaire (voir partie II). De plus, ils ont montré que les cellules appelées podocytes correspondaient à des plasmatoctes qui, sous l'effet de l'hormone de mue ecdysone, subissaient des modifications

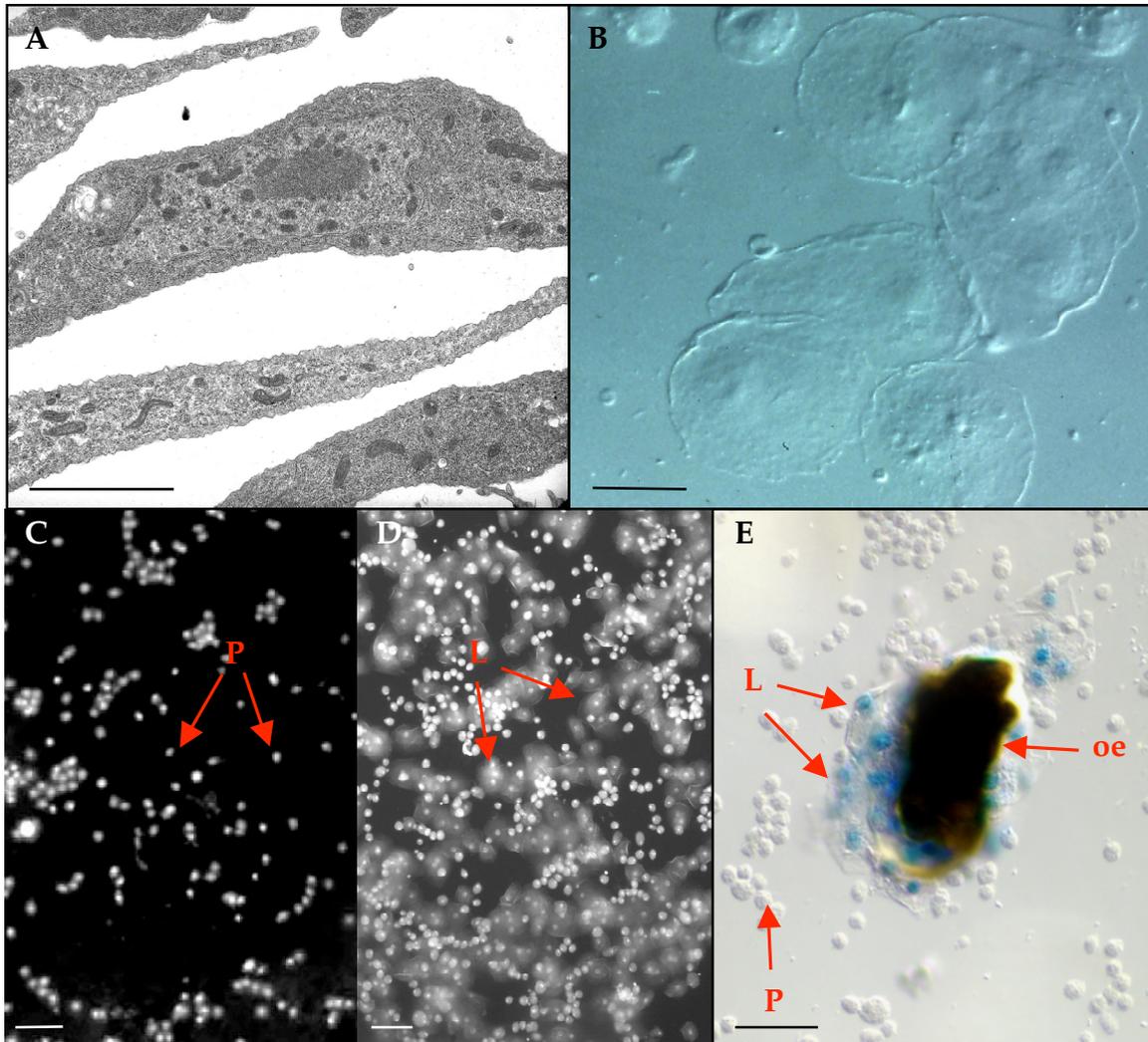


Figure 6 : Le lamellocyte. Observation de lamellocytes (A) au MET dans la glande de la lymphe et (B) en circulation au microscope à contraste de phase. (C,D) Coloration nucléaire au DAPI des hémocytes en circulation chez une larve saine (C) et chez une larve parasitée où les lamellocytes se sont différenciés massivement (D). Encapsulement d'un œuf de guêpe parasite *Leptopilina boulardi* (E). Un transposon P-LacZ inséré dans le gène *misshapen*, permet la coloration spécifique des lamellocytes lors d'une réaction histochimique au X-Gal. L'œuf tué a subi une mélanisation. P: plasmatocyte, L: lamellocyte, oe: œuf de *L. boulardi*. Barre (A): 10 μ m, (B): 20 μ m, (C,D,E): 40 μ m.

structurales et fonctionnelles au moment de l'empupement (étape de métamorphose). Ces plasmatoctes sont alors connus sous le terme de macrophages pupaux, et sont engagés dans une phagocytose intense des tissus larvaires histolysés. Les lamellocytes sont incapables de phagocytose, ils sont responsables de la formation de capsules autour d'éléments étrangers trop gros pour être phagocytés par les plasmatoctes, comme par exemple les endoparasitoïdes.

b. Les réactions d'encapsulation

Comme la mélanisation, l'encapsulation de parasites est un mécanisme très répandu chez les insectes, il permet d'isoler un parasite volumineux dans une capsule cellulaire pour l'éliminer (Figure 6E). Le parasitisme représente un réel danger pour les drosophiles dans la nature, en particulier pour les larves qui sont les hôtes de nombreux Hyménoptères (Carton et al., 1986). On dénombre au minimum une cinquantaine d'espèces différentes d'Hyménoptères qui infestent les larves de drosophile. Les réactions de défense contre les parasites représentent donc un véritable enjeu immunitaire pour la drosophile.

Les réactions d'encapsulation chez la drosophile reposent sur la différenciation des lamellocytes, qui en sont les principaux acteurs. Ces cellules représentent un type d'hémocytes un peu particulier dans le sens où il est absent de l'hémolymphe de larves saines, et ne se différencie qu'en cas de parasitisme.

La réaction d'encapsulation chez la drosophile s'effectue en plusieurs étapes. Lors d'une infection parasitaire, les plasmatoctes, qui sont les surveillants immunitaires en circulation, forment la première couche d'hémocytes qui entoure le parasite (Russo et al., 1996). Le mécanisme de reconnaissance du parasite est pour le moment inconnu. Lanot et al. (2001) proposent que, lorsque les plasmatoctes rencontrent un parasite qu'ils ne peuvent phagocyter, ils sécrètent un signal qui est perçu par les pro-hémocytes de la glande de la lymphe. La nature de ce signal est inconnue, il pourrait être de type cytokine ou facteur de croissance, et il déclencherait la différenciation des pro-hémocytes en lamellocytes.

Suite à l'infestation, les lamellocytes s'accumulent rapidement dans l'hémolymphe (Figure 6C,D). Ces lamellocytes sont des cellules avec de grandes capacités adhésives, ils entourent le parasite en formant plusieurs couches, afin de l'enfermer dans une capsule cellulaire. En partenariat avec les cellules à cristaux, la capsule est ensuite mélanisée et devient noire. Le parasite meurt certainement par asphyxie et par l'action des intermédiaires de réactions cytotoxiques de la mélanisation (Nappi et al., 1995; Nappi et al., 2000). La capsule reste ensuite une structure inerte,

qui ne gêne pas le développement de la drosophile. Elle traverse l'étape de métamorphose sans être éliminée, et est retrouvée dans l'abdomen des mouches adultes.

Il existe de nombreux mutants qui ont la particularité de présenter dans leur hémocoelome des tumeurs mélaniques. Ces tumeurs ont pour cause des mutations qui provoquent la différenciation massive de lamellocytes de façon constitutive, lesquels finissent par s'agréger entre eux dans une réaction de pseudo-encapsulation (Gateff, 1977; Gateff, 1994). Ces tumeurs peuvent également résulter d'une réaction «auto-immune» où des tissus larvaires endommagés sont encapsulés puis mélanisés.

Au laboratoire, pour tester la différenciation des lamellocytes et étudier la spécification de ce type hémocytaire, nous utilisons les guêpes endoparasitoïdes *Leptopilina boulardi*, un Hyménoptère de la famille des eucoilidés, parasite des larves de drosophile (Carton et al., 1986). Les infections sont simples à réaliser. Pour cela, il suffit de mettre en présence quelques femelles *L. boulardi* avec de jeunes larves de drosophile durant une période courte. Je décrirai dans la partie III de cette introduction les différents aspects de cette interaction hôte-parasite.

C. La coagulation

1. La coagulation chez la limule

La coagulation est un mécanisme de défense largement répandu dans le règne animal. Chez les arthropodes, la coagulation permet la synthèse d'une matrice utilisée pour colmater les blessures, afin de minimiser les pertes d'hémolymphe, et immobiliser les microorganismes pour éviter les infections. Les données les plus complètes concernant la coagulation chez les arthropodes ont été obtenues chez la limule (*Limulus polyphemus*, Chélicérate) (Iwanaga, 1993; Iwanaga and Kawabata, 1998; Theopold et al., 2004) (Figure 7). La réaction de coagulation résulte d'une cascade enzymatique qui est déclenchée par le LPS des bactéries à Gram négatif et le β (1-3)glucane des champignons. Les composantes de cette cascade sont stockées dans les granules des hémocytes, et sont rapidement libérées dans l'hémolymphe lorsque les hémocytes entrent en contact avec un pathogène. La cascade de coagulation aboutit à la conversion du coagulogène, une protéine soluble dans l'hémolymphe, en coaguline insoluble.

La cascade de coagulation requiert la participation de trois protéases à sérine libérées sous forme de zymogènes, les facteurs C, G et B, ainsi que de la proenzyme de coagulation (Iwanaga, 1993; Muta et al., 1990; Muta et al., 1993). Deux voies d'activation sont possibles. En présence de

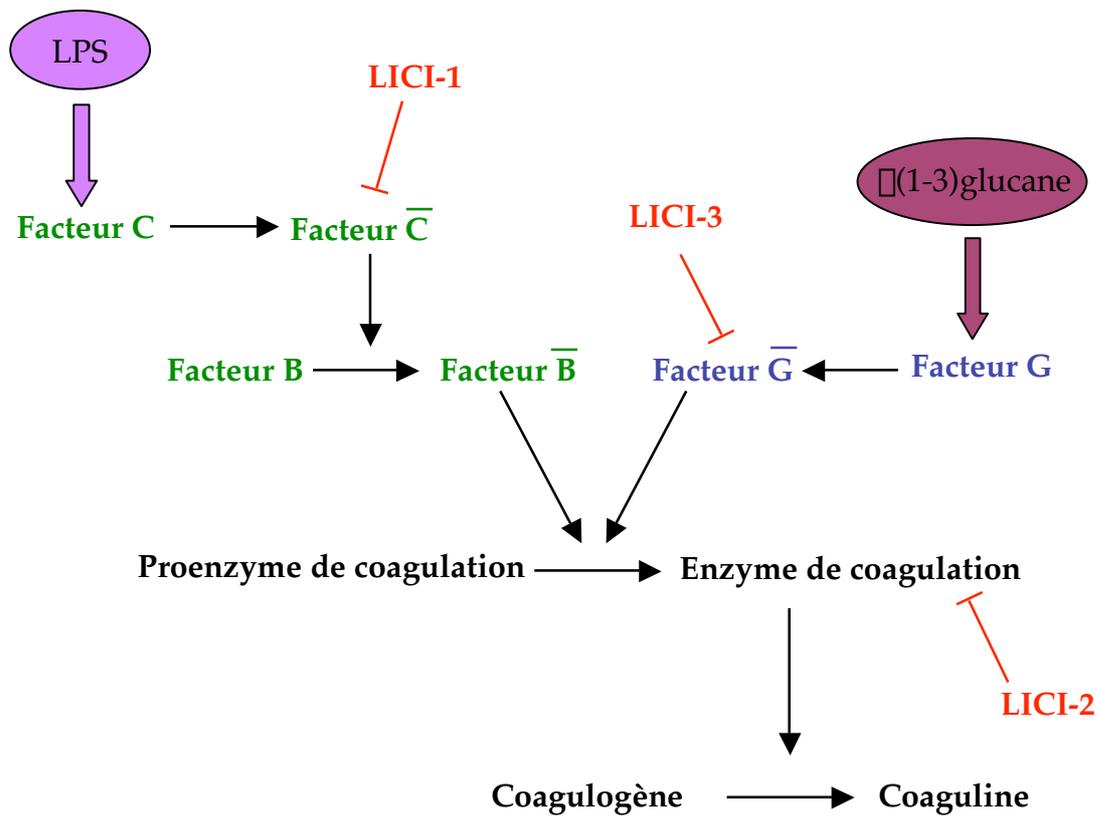


Figure 7: La coagulation chez la limule. Le LPS active le zymogène du facteur C en facteur \bar{C} actif. Le facteur \bar{C} actif va ensuite activer le facteur B en facteur \bar{B} , qui à son tour converti la pro-enzyme de coagulation en enzyme de coagulation. L'enzyme de coagulation coupe ensuite deux liaisons peptidiques du coagulogène pour former un gel insoluble de coaguline. La cascade est également activée par le $\beta(1-3)$ glucane, via un autre zymogène de protéase à sérine, le facteur G, qui active directement la proenzyme de coagulation. Trois inhibiteurs de protéases à sérine contrôlent cette cascade: LICI-1,-2 et -3. X représente le facteur actif.

LPS, le facteur C est activé par une coupure autocatalytique. Deux facteurs sont ensuite activés successivement par protéolyse, le facteur B et l'enzyme de coagulation, qui convertit le coagulogène. La deuxième voie passe par l'intermédiaire du facteur G, qui est activé de façon autocatalytique en présence de $\alpha(1-3)$ glucane. Le facteur G activé coupe directement la pro-enzyme de coagulation.

Ces réactions sont localisées au niveau du site de la blessure par trois inhibiteurs de protéase à sérine de la famille des serpinés (Agarwala et al., 1996; Miura et al., 1994; Miura et al., 1995). Ces inhibiteurs nommés LICI 1, 2 et 3 (Limulus Intracellular Coagulation Inhibitor 1,2,3) sont contenus dans les granules hémocytaires, et leur spectre d'inhibition a été déterminé de façon biochimique. LICI 1 inhibe spécifiquement le facteur C activé. LICI 2 inhibe principalement l'enzyme de coagulation, mais il peut également réduire, avec une affinité moindre, l'activité des facteurs C et G. LICI 3 inhibe principalement le facteur G activé.

2. La coagulation chez la drosophile

Bien que les mécanismes de coagulation soient relativement bien décrits chez certains arthropodes comme les crustacées, peu de données sont disponibles concernant la coagulation chez les insectes. Chez la drosophile, aucune cascade de protéase impliquée dans la coagulation n'a pour l'instant été mise en évidence. Cependant, le développement récent d'un protocole permettant l'isolement et l'étude biochimique des caillots d'hémolymphe a permis une avancée importante dans la description de ce processus chez la drosophile.

La formation du caillot d'hémolymphe chez les larves de drosophile commence avec la structuration d'un coagulum fibreux et visqueux. Ce coagulum correspond à un agrégat d'hémocytes, de débris cellulaires et de matrice extracellulaire. Des réactions de «cross-linking» du coagulum, qui lient de façon covalente les protéines, ainsi que la mélanisation, permettent la génération d'une matrice solide et insoluble. Comme chez la limule, la coagulation repose sur des facteurs humoraux, solubles dans l'hémolymphe, et sur des facteurs hémocytaires.

En réalité, les hémocytes interviennent à plusieurs niveaux dans ce processus où ils sont indispensables. En effet, les larves mutantes *domino*, qui sont dépourvues d'hémocytes, sont incapables de coaguler leur hémolymphe lors d'une infection ou d'une blessure (Scherfer et al., 2004). En premier lieu, les hémocytes sécrètent de nombreux constituants qui composent le caillot. Ceci est le cas de l'hémolectine (Goto et al., 2003), qui est le principal constituant du coagulum. C'est aussi le cas de la mucine gp150, une glycoprotéine portant de nombreuses O-glycosylations

(Korayem et al., 2004). Cette mucine prend part à la structuration du caillot d'hémolymphe où elle est capable d'interagir avec les bactéries pour les immobiliser.

Par le biais de la mélanisation, les cellules à cristaux participent également au durcissement du coagulum (Scherfer et al., 2004). Les larves *Bc*, dépourvues de cellules à cristaux, coagulent normalement mais le coagulum n'est pas mélanisé. Les phénoloxydases ne sont pas les seules enzymes impliquées dans ce processus, mais les nombreux intermédiaires cytotoxiques de la réaction contribuent à l'élimination des bactéries emprisonnées dans le caillot. Chez de nombreux arthropodes, d'autres enzymes telles que des transglutaminases et des peroxydases sont utilisées pour les réactions de «cross-linking» des protéines du coagulum (Theopold et al., 2004), ce qui pour l'instant n'a pas été démontré chez la drosophile.

De nombreuses protéines humorales constituant les caillots d'hémolymphe ont été identifiées par des études biochimiques et protéomiques. Nous pouvons citer, parmi les protéines connues, la Lipophorine, la Gelsoline, la Tiggrine (une protéine de la matrice extracellulaire), et FBP1 (Fat Body Protein 1, une protéine produite par le corps gras) (Karlsson et al., 2004; Scherfer et al., 2004).

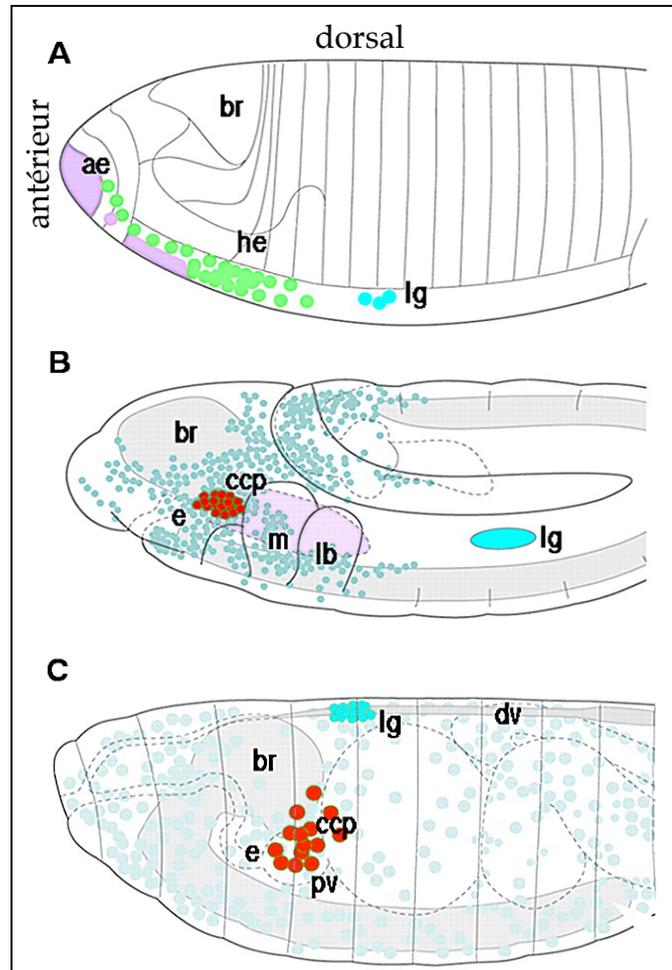
II. L'hématopoïèse chez la drosophile

A. Les processus hématopoïétiques

L'hématopoïèse chez la drosophile se déroule en deux phases distinctes au cours du développement ((Evans et al., 2003). La première vague de production des hémocytes a lieu au cours du développement embryonnaire, elle est qualifiée de vague primitive. Elle donne naissance à la première population d'hémocytes chez la drosophile. La deuxième vague d'hématopoïèse se déroule au cours des stades larvaires, au sein d'un organe spécialisé la glande de la lymphe. Durant la métamorphose, la glande de la lymphe disparaît et aucune hématopoïèse n'est plus observée chez l'adulte (Lanot et al., 2001).

1. L'hématopoïèse chez l'embryon

Par des expériences de transplantation, Holz et collaborateurs ont pu identifier les précurseurs des hémocytes embryonnaires dès le stade blastoderme cellulaire, c'est-à-dire avant la gastrulation (Holz et al., 2003). Les premiers signes de différenciation apparaissent après la



D'après Lebestky et al., 2000

Figure 8 : Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire chez *Drosophila melanogaster*. (A) Embryon de stade 5: le mésoderme antérieur est représenté en violet, les précurseurs hémocytaires en vert (he), les cellules précurseurs de la glande de la lymphe larvaire en bleu (lg). (B) Embryon de stade 11: les nombreux plasmacytes (bleus) commencent à migrer, alors que les cellules à cristaux (ccp, rouge) se différencient à proximité du futur proventricule. Les précurseurs de la glande de la lymphe commencent à migrer dorsalement. (C) Embryon de stade 17: les plasmacytes sont dispersés, les cellules à cristaux restent groupées au niveau du proventricule (pv); la glande de la lymphe s'organise dorsalement, le long du vaisseau dorsal (dv).

gastrulation, lorsque des cellules du mésoderme antérieur procéphalique commencent à exprimer un marqueur précoce □ la Peroxydasine (Nelson et al., 1994; Tepass et al., 1994) (Figure 8). Ces cellules vont ensuite migrer pour coloniser l'ensemble de l'embryon. Au cours de cette migration, la majorité des hémocytes se différencie et acquiert des propriétés caractéristiques des plasmacytes, qui sont alors des macrophages actifs qui ingèrent les cellules apoptotiques et produisent de la matrice extracellulaire (Franc et al., 1999; Tepass et al., 1994).

Simultanément à la différenciation des plasmacytes, une deuxième population d'hémocytes (de 20 à 30 cellules) se différencie à partir de la même région mésodermique, mais reste localisée au niveau du proventricule de l'intestin antérieur. Elle donne naissance aux cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000; Tepass et al., 1994) (Figure 8).

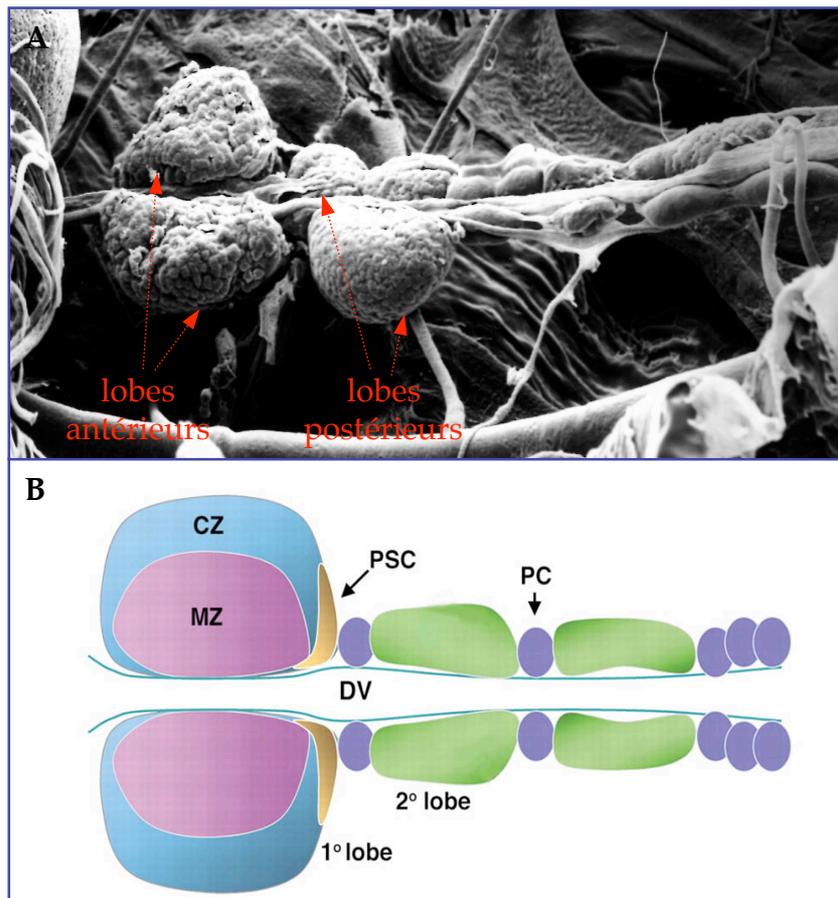
Les précurseurs de l'organe hématopoïétique larvaire se différencient, au cours de l'embryogenèse, à partir de cellules du mésoderme latéral (Tepass et al., 1994). Ces cellules migrent ensuite dorsalement pour se localiser de part et d'autre du vaisseau dorsal, et former les primordia de la glande de la lymphe (Figure 8).

2. L'hématopoïèse larvaire

A la fin de l'embryogenèse, les primordia de l'organe hématopoïétique se résument en deux lobes, contenant chacun une vingtaine de cellules, localisés le long du vaisseau dorsal de l'embryon. Ces cellules sont des prohémocytes, elles ne présentent aucune des caractéristiques morphologiques des hémocytes différenciés, et n'expriment aucun des marqueurs connus des plasmacytes ou des cellules à cristaux (Jung et al., 2005).

Durant les deux premiers stades larvaires, la croissance des lobes de la glande de la lymphe est limitée. En revanche, au cours du troisième stade, les hémocytes vont proliférer activement, la taille des lobes va augmenter, et des lobes supplémentaires vont se différencier postérieurement au premier. La glande de la lymphe de larves en fin de troisième stade est composée de 3 à 6 paires de lobes disposés le long du vaisseau dorsal (Figure 9A). On distingue les lobes primaires (ou antérieurs) des lobes secondaires (ou postérieurs) par leur position le long du vaisseau dorsal.

Récemment, une étude exhaustive de la glande de la lymphe a permis de décrire la présence dans les lobes antérieurs de trois régions qui se distinguent par leur morphologie et par leur composition hémocytaire (Jung et al., 2005) (Figure 9B). Ces trois régions sont le reflet d'une distribution très organisée des hémocytes. A la périphérie des lobes antérieurs, la zone corticale d'apparence granuleuse renferme essentiellement des hémocytes différenciés, c'est-à-dire des



D'après Jung et al., 2005

Figure 9: La glande de la lymphe. (A) Photographie de la glande de la lymphe de larve de troisième stade au microscope électronique à balayage. La glande est composée de 3 à 6 paires de lobes disposés le long du vaisseau dorsal. (B) Représentation schématique de la glande de la lymphe au troisième stade larvaire. MZ: zone médullaire, CZ: zone corticale, PSC: centre signalisateur postérieur, DV: vaisseau dorsal, PC: cellule péricardiale. (voir texte pour détails)

plasmotocytes et des cellules à cristaux. La zone médullaire, située dans la région médiane des lobes antérieurs, est d'apparence plus lisse que la zone corticale. Elle rassemble une population de cellules plus denses et non différenciées, les prohémyocytes. En accord avec cette distribution cellulaire, les hémyocytes de la zone corticale sont caractérisés par l'expression de nombreux marqueurs de lignages différenciés. Au contraire, la zone médullaire se définit par l'absence des marqueurs de différenciation. Il a été proposé que la zone corticale correspondrait à un site de maturation des prohémyocytes provenant de la zone médullaire.

La troisième région des lobes antérieurs correspond à un groupe de quelques cellules formant un compartiment indépendant, situé à l'extrémité postérieure des lobes antérieurs. Ce compartiment correspond au centre de signalisation postérieur (PSC pour Posterior Signaling Center) qui a été proposé comme jouant un rôle instructeur pour la différenciation des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2003). Les travaux de Jung et collaborateurs (2005) sur la structure de la glande de la lymphe ont identifié le PSC comme étant composé d'une population hémyocytaire unique, caractérisée par l'expression de marqueurs spécifiques, différents des marqueurs des hémyocytes matures ou indifférenciés.

3. La double origine ontogénique des hémyocytes de la drosophile

Par des expériences de transplantation, Holz et collaborateurs (Holz et al., 2003) ont établi une carte précise des tissus mésodermiques qui donnent naissance aux hémyocytes des deux vagues d'hématopoïèse. Les auteurs ont prélevé chez un embryon donneur exprimant la GFP de façon ubiquitaire, des cellules provenant de différentes régions du mésoderme. Ces cellules furent ensuite greffées à différents endroits du mésoderme chez des embryons receveurs. Cette technique permet de localiser avec précision les domaines donnant naissance aux hémyocytes embryonnaires ou larvaires. Elle permet également de déterminer l'autonomie cellulaire, et de suivre le destin des cellules greffées à travers les différents stades du développement.

A titre d'exemple, lorsqu'une cellule mésodermique provenant de la région qui va donner naissance aux hémyocytes embryonnaires est greffée dans la même région de l'embryon receveur, elle va donner naissance à de nombreux hémyocytes GFP⁺ chez l'embryon. Dans ce cas, aucun autre tissu n'exprime la GFP ce qui démontre que ces cellules acquièrent leur identité hémyocytaire de façon précoce au cours du développement. En effet, les cellules furent prélevées au stade blastoderme cellulaire, avant la gastrulation. De façon tout à fait surprenante, ces travaux ont mis en évidence, pour la première fois, que le pool de plasmotocytes embryonnaires subsiste au stade

larvaire et qu'il constitue l'ensemble des plasmacytes circulants chez la larve. De plus, une proportion des hémocytes embryonnaires est toujours visible chez l'adulte.

Ces résultats furent un bouleversement pour nos études car l'idée commune était que la glande de la lymphe représentait la principale source d'hémocytes larvaires et adultes. Lorsque les cellules du mésoderme latéral, qui donnent naissance à la glande de la lymphe, sont greffées dans la même région de l'embryon receveur, les cellules transplantées vont prendre part à la glande de la lymphe. Ils ont ainsi observé qu'en réalité la glande de la lymphe ne libère, en condition normale et sans infection, aucun hémocyte avant la fin du troisième stade larvaire, c'est-à-dire peu de temps avant la métamorphose.

B. La régulation génétique de l'hématopoïèse

1. Le facteur GATA Serpent

Les facteurs GATA sont des régulateurs transcriptionnels caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN largement conservé au cours de l'évolution. Chez les vertébrés, les facteurs GATA ont de nombreux rôles dans les programmes de développement. Ils sont impliqués dans la différenciation et le développement de nombreux organes. Les facteurs GATA 1, 2 et 3 sont nécessaires pour différentes étapes de l'hématopoïèse chez la souris (Orkin, 1998) GATA 4, 5, 6 sont nécessaires pour le développement de nombreux organes d'origine mésodermiques, comme l'intestin et le foie, et sont impliqués dans la différenciation de l'endoderme (Molkentin, 2000).

Cinq homologues des facteurs GATA sont codés dans le génome de la drosophile, parmi lesquels trois ont été caractérisés, *serpent* (*srp*), *pannier* et *grain*. Leurs fonctions ont été étudiées chez l'embryon et seule l'activité du gène *srp* est démontrée pour le développement hématopoïétique de la drosophile (Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996). Au cours du développement embryonnaire, *srp* est exprimé dans les cellules mésodermiques précurseurs des hémocytes embryonnaires (Rehorn et al., 1996). L'activité du gène *srp* est indispensable pour attribuer aux cellules du mésoderme antérieur leur identité hémocytaire, et les engager dans les lignages hématopoïétiques (Figure 10). *Srp* représente un marqueur hémocytaire précoce, il est exprimé par les précurseurs avant tout autre marqueur de différenciation connu des hémocytes embryonnaires. Il est exprimé au stade larvaire par les pro-hémocytes ainsi que par les hémocytes différenciés (Lebestky et al., 2000; Rehorn et al., 1996).

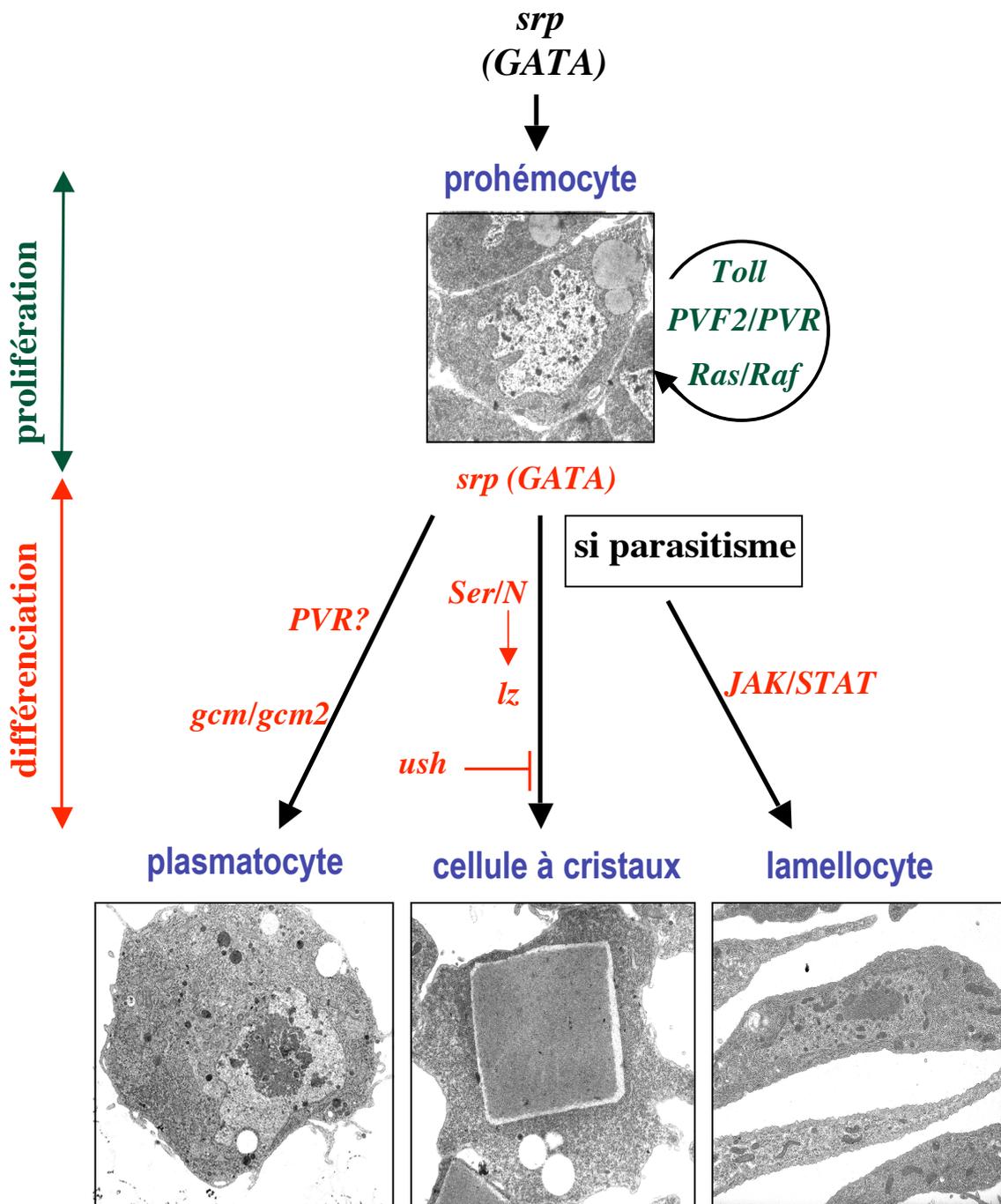


Figure 10: Régulations génétiques de l'hématopoïèse chez la drosophile. Ce schéma regroupe nos connaissances des régulations génétiques qui contrôlent l'hématopoïèse embryonnaire et/ou larvaire. (voir texte pour détails)

Les embryons mutants *srp* présentent très peu de cellules mésodermiques engagées dans un destin hémocytaire et aucun de ces hémocytes n'arrive à maturité (Rehorn et al., 1996) Les mutations *srp* sont létales en fin d'embryogenèse, ce qui empêche l'étude de son rôle au cours de l'hématopoïèse larvaire. Cependant, on peut supposer qu'il garde ces mêmes fonctions puisqu'il est présent dans toutes les cellules de la glande de la lymphé (Lebestky et al., 2000).

Des études récentes ont montré que deux isoformes du facteur Srp sont générées par épissage alternatif (Waltzer et al., 2002) Une isoforme SrpNC contenant deux doigts de zinc en C- et N-terminal, et une isoforme SrpC, qui ne présente qu'un seul doigt de zinc en C-terminal. La présence des doigts de zinc aux extrémités de la protéine est une caractéristique commune des facteurs GATA des vertébrés. Bien que ces deux isoformes présentent certaines caractéristiques fonctionnelles identiques, SrpNC présente une affinité de liaison à l'ADN différente de celle de SrpC. Le doigt de zinc en N-terminal est un site d'interaction avec des facteurs de lignage qui contrôlent les spécifications hémocytaires. Ces interactions vont modifier l'activité du facteur SrpNC qui régule alors différemment l'expression de plusieurs gènes cibles (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003). Ces interactions seront décrites plus loin.

2. Les facteurs de lignage

Chez l'embryon des facteurs de transcription spécifiques de lignage, agissant en aval de Srp, orchestrent les processus de ségrégation des prohémoctes en deux populations cellulaires distinctes les plasmatoctes et les cellules à cristaux.

a. Les protéines à doigt de zinc Glial Cell Missing (Gcm) et Gcm2

Les protéines à doigt de zinc Gcm et Gcm2 contrôlent la prolifération et le développement des plasmatoctes (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997) (Figure 10). *gcm* (aussi connu sous le nom *glide*) a été identifié pour son rôle lors de la formation du système nerveux chez l'embryon. Gcm y agit comme un «commutateur» en régulant l'expression des gènes qui exécutent le programme de différenciation des cellules gliales, au détriment des neurones (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995). *gcm2* fut identifié plus tard pour son homologie avec *gcm*. Sa caractérisation a démontré qu'il présente des fonctions partiellement redondantes avec *gcm* dans la gliogenèse et dans le développement des macrophages embryonnaires (Alfonso and Jones, 2002) Gcm et Gcm2 ne sont pas nécessaires pour la spécification initiale des plasmatoctes, ils sont cependant indispensables pour leur maturation. Chez l'embryon, en absence de *gcm* et/ou *gcm2*, seul un nombre très limité d'hémocytes expriment le marqueur Croquemort des plasmatoctes

différenciés, ce qui reflète un défaut important de différenciation (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997).

L'expression de Gcm et Gcm2 dans les hémocytes embryonnaires est sous le contrôle transcriptionnel du facteur Srp. Ces deux facteurs sont exprimés de façon transitoire et, en fin d'embryogenèse, les plasmatoctes pleinement différenciés n'expriment plus ces facteurs (Alfonso and Jones, 2002; Bernardoni et al., 1997).

b. Le facteur à domaine Runt Lozenge

Les protéines à domaine Runt sont connues chez les vertébrés sous la dénomination RUNX. Le domaine Runt est une séquence de liaison à l'ADN et les protéines correspondantes agissent comme régulateurs transcriptionnels.

L'activité du facteur RUNX Lozenge (Lz) est indispensable à la fois chez l'embryon et chez la larve de drosophile pour la différenciation des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2000) (Figure 10). Les mutants thermosensibles *lz^{ts1}*, placés à température restrictive (29°C), sont totalement dépourvus de cellules à cristaux, alors que la différenciation des plasmatoctes n'est pas affectée. L'expression de Lz disparaît chez les embryons perte-de-fonction *srp*, ce qui place Lz en aval du facteur Srp, de même que Gcm/Gcm2. Lz est exprimé par les pro-cellules à cristaux, mais également par les cellules à cristaux différenciées, y compris celles de la glande de la lymphe jusqu'à la fin des stades larvaires. Cette expression ininterrompue suggère que Lz est également important pour le maintien de cette population hémocytaire ou dans leur fonction.

c. La protéine Friend Of GATA U-Shaped

Les protéines de la famille des Friend Of GATA (FOG) sont des protéines à doigt de zinc qui agissent comme régulateurs fonctionnels des facteurs GATA. Ces protéines peuvent tout aussi bien agir en tant que coactivateurs et que corépresseurs. Les protéines FOG modifient les activités régulatrices des facteurs GATA en interagissant directement avec leur N-finger (doigt de zinc N-terminal).

Le facteur U-Shaped (Ush) de drosophile est l'homologue des protéines FOG de mammifères. Ce facteur est identifié comme un régulateur négatif du développement des cellules à cristaux (Fossett et al., 2001) (Figure 10). Ush est exprimé par les pro-hémocytes et les plasmatoctes tout au long du développement embryonnaire et larvaire, et son expression chez l'embryon dépend de l'activité du facteur Srp. Une expression accrue de Ush dans les

prohémocytes embryonnaires réduit de façon importante le nombre de cellules à cristaux, alors qu'une perte-de-fonction entraîne une augmentation de cette population (Fossett et al., 2001). La répression de *ush* est, de ce fait, une étape importante pour permettre le développement des cellules à cristaux.

d. Les actions combinatoires de Srp, Lz et Ush

Des études biochimiques ont récemment mis en évidence que la protéine FOG Ush inhibe le développement des cellules à cristaux en réprimant l'activité du facteur GATA SrpNC (Fossett et al., 2003) □ i) la surexpression mésodermique de SrpC ou de SrpNC suffit à augmenter le nombre de cellules à cristaux. ii) la surexpression combinatoire de Ush avec SrpC provoque également une augmentation du nombre de cellules à cristaux, iii) alors que la surexpression de Ush conjointement à SrpNC bloque complètement leur différenciation. Ces expériences montrent que Ush ne peut pas interagir avec SrpC, qui n'a pas de N-finger, et qu'il ne peut interagir qu'avec SrpNC pour interférer avec son rôle promoteur dans le développement des cellules à cristaux.

Deux études indépendantes ont mis en évidence que Srp agit également de façon synergique avec Lz pour induire la différenciation des cellules à cristaux (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2003). Des expériences *in vitro* ont montré que ces deux protéines interagissent par l'intermédiaire des motifs doigt de zinc (Srp) et du domaine Runt (Lz). En effet, l'expression mésodermique de Lz seule ne réprime pas la transcription de Ush dans les prohémocytes. En revanche, elle est fortement inhibée lorsque Lz et SrpNC sont surexprimés ensemble. En accord avec ces observations, les surexpressions individuelles des facteurs Lz et SrpNC n'entraînent qu'une augmentation modeste du nombre de cellules à cristaux, alors que la double surexpression Lz et SrpNC provoque une augmentation bien plus importante.

Le facteur SrpNC présente une activité versatile en fonction du partenaire, Ush ou Lz, avec lequel il interagit. Des données suggèrent que Ush et Lz sont en compétition pour se fixer au facteur Srp, et que les interactions qui s'effectuent dépendent des concentrations relatives de ces trois protéines (Fossett et al., 2003) dans les précurseurs hémocytaires. La nature de ces interactions détermine le programme de différenciation enclenché.

3. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est conservée au cours de l'évolution, elle est présente autant chez les invertébrés que chez les vertébrés où elle joue des rôles essentiels dans le développement (Lai, 2004). La voie Notch agit fréquemment en limitant les choix de différenciation de cellules précurseurs, grâce à un mécanisme de communication de cellule à cellule. Notch (N) est un récepteur transmembranaire présent à la surface de nombreux types cellulaires. Pour être activé, Notch doit interagir avec l'un de ses ligands transmembranaires, présent à la surface des cellules voisines. L'activation du récepteur Notch entraîne la coupure protéolytique du domaine intracellulaire, qui devient alors un facteur de transcription. Il est ensuite acheminé dans le noyau où il régule l'expression des gènes cibles.

La voie Notch fut initialement identifiée pour son rôle dans le développement de l'aile chez la drosophile. Dans ce modèle, elle régule de nombreux processus développementaux, parmi lesquels la formation du système nerveux central et périphérique, la myogenèse, la cardiogenèse, la formation des yeux et des appendices adultes (Lai, 2004; Portin, 2002). Le génome de la drosophile code un seul récepteur Notch, et deux ligands, Serrate (Ser) et Delta. En comparaison, chez les mammifères, on dénombre quatre récepteurs Notch (Notch1-4) et cinq ligands (Delta-like 1,2,3 et Jagged 1,2).

Une étude récente a démontré le rôle crucial de la voie Notch dans la spécification des précurseurs de la glande de la lymphe, au cours de l'embryogenèse (Mandal et al., 2004). Cette étude est en faveur de l'existence d'un hémangioblaste chez la drosophile. L'hémangioblaste des vertébrés correspond à une cellule bipotentielle d'origine mésodermique, qui peut donner naissance à la fois aux cellules sanguines et aux cellules vasculaires. L'existence d'un hémangioblaste chez les embryons de drosophile est suggérée par l'observation que les cellules de la glande de la lymphe, ainsi que les cardioblastes (cellules qui forment le vaisseau dorsal) et les cellules péricardiales (qui séparent les lobes successifs de la glande de la lymphe), dérivent chez l'embryon de progéniteurs mésodermiques communs. Le développement de cet hémangioblaste présomptif a révélé que la voie Notch favorise la spécification des précurseurs de la glande de la lymphe en réprimant celui des cardioblastes (Mandal et al., 2004).

Une deuxième fonction, plus tardive, pour la voie Notch dans l'hématopoïèse fut décrite par deux études simultanées. En effet, la voie Notch joue un rôle instructif pour la différenciation des cellules à cristaux au stade larvaire (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003) (Figure 10). Des mutations perte-de-fonction pour Notch réduisent de façon importante le nombre des cellules à

cristaux, alors que l'expression d'une forme constitutivement active du récepteur provoque la différenciation d'un grand nombre de ces hémocytes. L'expression de Lz dans les cellules à cristaux est contrôlée par la voie Notch (Lebestky et al., 2003).

Dans ce processus, le ligand Ser assure l'activation du récepteur Notch. En effet, bien que la surexpression des deux ligands Ser et Delta puisse provoquer une différenciation massive de cellules à cristaux, seule la perte de fonction de Ser affecte leur différenciation (Duvic et al., 2002). L'analyse de l'expression de Ser dans la glande de la lymphé a conduit à l'identification du centre de signalisation postérieur (PSC) puisque cette expression est restreinte à ce groupe de cellules (Lebestky et al., 2003). Il est suggéré que les cellules du PSC interagissent avec les prohémocytes de la glande de la lymphé pour induire, via l'interaction Ser/Notch, la différenciation des cellules à cristaux.

4. Le récepteur PVR (PDGF-VEGF Receptor)

Chez les mammifères, les récepteurs des facteurs de croissance Platelet Derived Growth Factors (PDGFs) et Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) sont des récepteurs de type tyrosine-kinase, impliqués de façon générale dans des processus de prolifération et de différenciation cellulaire.

Deux facteurs de croissance de type PDGF (PDGF-A et B) et deux récepteurs PDGFR (PDGFR α et β) sont caractérisés chez les mammifères (Hoch and Soriano, 2003). Des expériences de «knock out» ont démontré que PDGF-B et PDGFR β sont essentiels dans les embryons de souris pour le développement vasculaire. PDGF-A et PDGFR α ont des expressions plus ubiquitaires à ce stade chez la souris, où ils assurent plusieurs fonctions essentielles comme les migrations cellulaires, le développement de cellules neurales du système nerveux central et le développement de la crête neurale.

Trois récepteurs VEGFR sont connus chez la souris (VEGFR-1, 2, 3), ainsi que cinq ligands (VEGF-A, B, C, D et PlGF) (Ferrara et al., 2003). Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont tous deux essentiels pour la morphogénèse et le développement du système vasculaire. Ces deux récepteurs remplissent d'autres fonctions importantes. Entre autres, VEGFR-1 est présent à la surface des monocytes-macrophages et est impliqué dans la migration des monocytes. VEGFR-2 est présent à la surface des cellules souches hématopoïétiques et est indispensable à leur développement.

Le génome de la drosophile code un seul récepteur tyrosine kinase homologue des récepteurs PDGFs et VEGFs de mammifères, appelé PVR (pour PDGF VEGF Receptor), il code également trois ligands PVF1, 2 et 3 (Cho et al., 2002; Duchek et al., 2001).

Les récepteurs PDGFR et VEGFR sont impliqués chez la souris dans les migrations cellulaires en direction des ligands attracteurs, un phénomène connu sous le nom de chimiotactisme. Un tel rôle pour PVR fut également décrit pour la migration des cellules somatiques vers l'oocyte, qui sécrète PVF1, dans la chambre de l'œuf au cours de l'ovogenèse (Duchek et al., 2001). PVR dirige également la migration des hémocytes embryonnaires (Cho et al., 2002). De façon intéressante, les ligands PVF sont exprimés par les tissus qui longent les voies de migration empruntées par les plasmotocytes embryonnaires (Cho et al., 2002). En accord avec cette fonction, la première expression de *PVR* apparaît dans les plasmotocytes embryonnaires (Heino et al., 2001). Son expression est ensuite maintenue dans les plasmotocytes différenciés, ainsi que dans les plasmotocytes de la glande de la lymphe (Munier et al., 2002).

Cependant, les résultats d'une étude plus récente suggèrent que les défauts de migration des plasmotocytes chez les embryons perte-de-fonction *PVR* auraient pour cause une diminution de la survie des hémocytes dans ce contexte génétique (Bruckner et al., 2004). Ces auteurs ont montré que PVR a un effet antiapoptotique dans les hémocytes embryonnaires.

Un rôle supplémentaire pour PVR et son ligand PVF2 dans la prolifération des précurseurs hémocytaires a été montré chez la larve (Munier et al., 2002). De façon spectaculaire, la surexpression ubiquitaire de PVF2 provoque une surprolifération des hémocytes larvaires (jusqu'à 300 fois), au détriment des programmes de différenciation. Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Jung et collaborateurs (2005) qui ont généré des clones mutants *PVR* dans la glande de la lymphe. Ces auteurs ont observé qu'une perte-de-fonction *PVR* affecte le développement des plasmotocytes.

Le récepteur PVR et la voie Ras/Raf/MAPK

Les voies Ras/Raf et MAPK sont des cibles potentielles du récepteur PVR du fait de l'observation que PVR induit l'activation de la voie MAPK dans les cellules Schneider en culture (Duchek et al., 2001), et que l'expression de PVR coïncide avec l'activation de MAPK dans les hémocytes embryonnaires (Bruckner et al., 2004; Cho et al., 2002). Brückner et collaborateurs ont démontré que la surexpression d'une forme constitutivement active de Ras chez les embryons *PVR* est capable de sauver le phénotype de défaut de migration et de mort par apoptose des plasmotocytes embryonnaires (Bruckner et al., 2004). Ces résultats suggèrent une coopération

fonctionnelle entre PVR et la cascade cytoplasmique Ras/Raf/MAPK pour relayer les informations de survie et de migration.

Plusieurs études ont également impliqué la voie Ras/Raf/MAPK dans la prolifération des hémocytes chez la drosophile. L'expression d'une forme activée de Ras dans la population hémocytaire provoque une prolifération importante des cellules sanguines. Cette signalisation est relayée par la voie D-Raf/MAPK (Asha et al., 2003; Kwon et al., 2000). Aucune étude n'a pour le moment démontré une épistasie entre PVR et les voies Ras/Raf/MAPK dans le contrôle de la prolifération des hémocytes chez la drosophile. Cependant, compte tenu des résultats décrits ci-dessus, il est vraisemblable que les voies Ras/Raf et MAPK agissent sur la prolifération des hémocytes en aval de PVR.

5. La voie JAK/STAT

La voie Janus kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) présente une grande conservation de ses composantes et de ses fonctions au cours de l'évolution. Les Janus kinases sont des tyrosine kinases cytoplasmiques qui ont pour rôle de transmettre les signaux émis par différentes cytokines lorsque celles-ci se lient à leurs récepteurs (pour revue (O'Shea et al., 2002; Schindler, 2002)). La fixation du ligand sur le récepteur de cytokine entraîne la dimérisation du récepteur ainsi qu'un changement conformationnel de sa région intracytoplasmique. Ce changement de conformation appose les kinases JAK qui leur sont associées, lesquelles s'activent par transphosphorylation de résidus tyrosines clefs. Ces résidus tyrosines représentent des sites d'amarrage pour les facteurs STAT localisés dans le cytoplasme, ainsi que pour d'autres protéines qui reconnaissent ces motifs. Une fois recrutés, les facteurs STAT sont activés par des phosphorylations qui sont assurées par la JAK. Les facteurs STAT activés sont alors transportés dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles. L'activité de la voie JAK/STAT est régulée par des inhibiteurs de deux types : les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) qui se fixent directement aux facteurs STATs, et les SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) qui inhibent l'activité du récepteur ou de la kinase JAK (Hou et al., 2002). Chez les mammifères, quatre JAK kinases et sept STAT ont été caractérisés et sont impliqués dans de nombreux processus de prolifération et de différenciation cellulaire. On dénombre également cinq protéines PIAS et au minimum huit protéines de type SOCS.

Chez la drosophile, la voie JAK/STAT a initialement été identifiée pour son rôle dans le développement embryonnaire où elle contrôle la segmentation (Binari and Perrimon, 1994; Perrimon and Mahowald, 1986). La caractérisation de la voie JAK/STAT chez la drosophile a fait

apparaître une image simplifiée par rapport aux mammifères. Le génome de la drosophile ne code qu'une seule kinase de type JAK appelée Hopscotch (Hop), et une seule protéine STAT nommée Stat92E (aussi connue sous le nom de Marelle). A l'heure actuelle, un seul récepteur de la voie, appelé Domeless (Dome) (Brown et al., 2001; Chen et al., 2002), ainsi que trois ligands, Unpaired (Upd) (Harrison et al., 1998), Upd2 et Upd3 (Agaisse et al., 2003; Gilbert et al., 2005; Hombria and Brown, 2002) sont identifiés. Un seul gène codant un homologue des PIAS de mammifères et agissant en aval de Hop est présent chez la drosophile (Betz et al., 2001), alors que plusieurs gènes codant des homologues de protéines SOCS ont été décrits (Callus and Mathey-Prevot, 2002).

Des mutations qui produisent une forme constitutivement active de la kinase Hop, telle que la mutation dominante hop^{Tum-l} ($hop^{Tumorous-lethal}$), affectent de façon importante l'hématopoïèse et provoquent des phénotypes sévères. La mutation hop^{Tum-l} est associée à une glande de la lymphé hypertrophiée, et une différenciation anormale de nombreux lamellocytes avec formation de pseudo-tumeurs mélaniques (Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995). Il a souvent été rapporté que la mutation hop^{Tum-l} provoque également une surprolifération des hémocytes, plaçant ainsi la voie JAK/STAT dans le contrôle de la prolifération des précurseurs hémocytaires (Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995). Cependant, Remillieux-Leschelle et collaborateurs ont montré que les mutations perte-de-fonction hop^{M38} n'ont aucun effet sur la densité hémocytaire ou sur les hémocytes en circulation (Remillieux-Leschelle et al., 2002). En contexte hop^{Tum-l} , les mutations qui diminuent l'activité de Stat92E ont un effet suppresseur sur la différenciation des lamellocytes et la formation des pseudo-tumeurs (Dearolf, 1998). Ces résultats suggèrent que la voie JAK/STAT régule l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des lamellocytes (Figure 10). Cette hypothèse fut confirmée par les travaux de Sorrentino et al., qui ont montré que la différenciation des lamellocytes est dépendante de Hop et Stat92E {Sorrentino, 2004 #458}.

Les mutations invalidant *domeless* et *unpaired* sont létales embryonnaires. De ce fait, les rôles potentiels de ces deux protéines dans l'hématopoïèse larvaire de la drosophile n'ont, pour le moment, pas pu être établis. *upd2* et *upd3* ont été identifiés récemment pour leur homologie avec *upd* (Hombria and Brown, 2002).

Il a été montré que des infections bactériennes induit dans les hémocytes des mouches adultes la production et la sécrétion de la cytokine Upd3 (Agaisse et al., 2003). Une fois sécrétée, Upd3 active la voie JAK/STAT dans les cellules du cros gras, laquelle va alors induire l'expression de la protéine de stress TurandotA. Cependant, lors d'une infection par les bactéries à Gram négatif, la voie IMD seule par l'intermédiaire de son récepteur PGRP-LC est capable d'induire l'expression de *totA*.

6. La voie Toll

L'indication que la voie Toll est impliquée dans le développement des hémocytes provient de l'observation que les mutations qui affectent l'activité de cette voie ont un effet sur la population hémocytaire chez la larve. Les mutations perte-de-fonctions de *Toll*, *tube* et *pelle* entraînent une diminution de la concentration des cellules sanguines en circulation (Qiu et al., 1998). Nous savons aussi que la mutation *Toll^{10B}*, qui engendre un récepteur Toll constitutivement actif, provoque un phénotype comparable à celui observé avec la mutation *hop^{Tum-l}*, c'est-à-dire une augmentation du nombre d'hémocytes circulants, la présence de nombreux lamellocytes avec formation de pseudo-tumeurs mélaniques. Des études plus récentes confirment le contrôle de la voie Toll sur la prolifération des cellules sanguines en circulation (Sorrentino et al., 2004). Cependant, elles suggèrent que la différenciation des lamellocytes dans le contexte *Toll^{10B}* serait due à une activation secondaire qui n'est pas directement liée à la mutation. Cette suggestion découle du fait que les larves mutantes pour la voie Toll, contrairement aux larves *stat92E*, gardent leur capacité à produire des lamellocytes à un niveau statistiquement identique aux larves contrôles. La voie Toll semble donc agir uniquement dans les mécanismes de prolifération des hémocytes, et n'est pas impliquée dans la différenciation des lamellocytes.

C. Comparaison des systèmes hématopoïétiques des mammifères et de la drosophile

Chez la souris, les premières cellules hématopoïétiques apparaissent peu après la gastrulation dans le mésoderme extra-embryonnaire du sac vitellin (SV), au sein de structures nommées « îlots sanguins », dans lesquelles cellules endothéliales et hématopoïétiques se différencient simultanément. Cette première vague de production de cellules souches hématopoïétiques (CSH), ou hématopoïèse primitive, engendre essentiellement des érythrocytes primitifs transitoires. L'hématopoïèse définitive prend place secondairement, dans les tissus embryonnaires et foetaux, le foie, le thymus, la rate, la moelle osseuse (et la bourse de Fabricius chez les oiseaux), lorsque ces tissus sont colonisés par une deuxième vague de CSH extrinsèques circulantes. Il a été démontré que l'ensemble des cellules hématopoïétiques présentes après la naissance provenaient de l'embryon lui-même, à savoir du mésoderme de la splanchnopleure para-aortique. Cependant, l'absence de participation du SV à l'hématopoïèse définitive des mammifères reste encore à établir expérimentalement.

Les vertébrés ont un répertoire varié de cellules sanguines possédant diverses fonctions. Cependant toutes ces cellules dérivent du même groupe de CSH pluripotentes. De telles cellules souches n'ont pas été identifiées chez la drosophile, néanmoins les données concernant les prohémyocytes et leur capacité à se différencier en n'importe quel type hémyocytaire suggèrent que ces cellules représentent des précurseurs hématopoïétiques pluripotentiels.

J'ai décrit dans la partie précédente les facteurs et les voies de signalisation qui contrôlent, chez la drosophile, les différents aspects de l'hématopoïèse. La drosophile possède un système hématopoïétique relativement simple comparé à celui des mammifères, puisque les cellules sanguines sont moins diversifiées et les fonctions moins nombreuses. En faisant le parallèle entre le contrôle génétique du développement des cellules sanguines chez la drosophile et chez les mammifères, nous constatons de nombreuses similitudes entre ces deux systèmes. Cette partie de l'introduction est consacrée à la présentation la régulation génétique de l'hématopoïèse des mammifères, qui met en jeu les voies de signalisation et les facteurs de transcription décrits précédemment chez la drosophile.

1. Les facteurs GATA, FOG et Runx dans l'hématopoïèse des mammifères

Au total, six facteurs GATA sont connus chez la souris, GATA-1,2,3 ont des rôles prépondérants dans le développement des cellules sanguines, GATA-4,5,6 sont impliqués dans la formation de l'endoderme et dans la différenciation de plusieurs organes d'origine endodermique.

Chez la drosophile, le facteur GATA *Srp* est indispensable aux processus hématopoïétiques pour conférer aux précurseurs mésodermiques une identité de cellules sanguines (Rehorn et al., 1996). Le développement des cellules sanguines chez les mammifères requiert également l'activité d'un membre de cette famille, GATA-2. GATA-2 contrôle la prolifération et la survie des cellules souches. L'inactivation génétique de *srp* chez les embryons de drosophile et celle de *GATA-2* chez la souris bloquent les processus hématopoïétiques, conduisant à une perte totale de toutes les cellules sanguines (Fossett et al., 2001) *Srp* n'est pas uniquement requis pour le développement des précurseurs hémyocytaires de la drosophile, il va également diriger les programmes de différenciation des plasmacytes et des cellules à cristaux. D'une façon analogue, des facteurs GATA sont responsables de la spécification de lignages cellulaires chez les mammifères □ GATA-1 est requis pour l'hématopoïèse définitive et permet la différenciation des érythrocytes, des mégacaryocytes et des éosinophiles, alors que GATA-3 est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T.

Précédemment, j'ai décrit chez la drosophile la protéine Ush, homologue des co-régulateurs transcriptionnels de la famille des FOG de mammifères. Les protéines de cette famille se fixent aux facteurs GATA pour moduler leur activité transcriptionnelle. SrpNC, sous forme libre est capable d'induire l'expression de *Lz*, permettant ainsi le développement des cellules à cristaux. En interagissant avec Ush, SrpNC devient alors un antagoniste des cellules à cristaux. Ce complexe réprime l'expression de *lz*, engageant ainsi les cellules dans un destin plasmatocte (Fossett et al., 2003). D'une façon similaire, chez la souris, GATA-1 va promouvoir la différenciation des éosinophiles alors que sous forme complexée à FOG-1, il inhibe la différenciation de ce type de cellules sanguines (Querfurth et al., 2000). En revanche la formation du complexe GATA-1/FOG-1 est indispensable pour activer la différenciation des érythrocytes et des mégacaryocytes (Tsang et al., 1998; Tsang et al., 1997).

2. Les facteurs à domaine Runt

Le développement des cellules à cristaux chez la drosophile est placé sous le contrôle transcriptionnel de *Lz* (Lebestky et al., 2000), un membre de la famille des transactivateurs Runx caractérisés par la présence d'un domaine Runt. Chez les mammifères, Runx1 est requis très tôt au cours de l'embryogenèse pour spécifier les précurseurs myéloïdes. Les souris déficientes *Runx1*^{-/-} meurent à un stade précoce suite à un arrêt du développement des cellules sanguines (Coffman, 2003). De façon intéressante, la protéine *Lz* présente une grande identité de séquence avec Runx1 (71% au niveau du domaine Runt), qui est également connu sous le nom de AML-1 chez l'homme. AML-1 est une cible fréquente de translocations chromosomiques à l'origine de leucémies myéloïdes aiguës (Lenny et al., 1997).

3. La voie JAK/STAT

Chez la drosophile, une perte d'activité de la voie JAK/STAT entraîne une baisse de la densité des hémocytes ainsi qu'un défaut de différenciation des lamellocytes. Une suractivation de cette voie provoque, au contraire, une différenciation abondante de lamellocytes.

De nombreuses études de Knock-Out chez la souris, ainsi que l'analyse de mutations chez des personnes malades, indiquent que la voie JAK/STAT joue également des rôles fondamentaux dans le développement hématopoïétique des mammifères (Schindler, 2002)

Ainsi, des souris déficientes *JAK2*^{-/-} meurent prématurément au cours de la gestation suite à un blocage de l'érythropoïèse. En accord avec un rôle de JAK2 dans l'hématopoïèse, une translocation chromosomique qui génère une protéine de fusion entre le facteur de transcription

Tel et la kinase JAK2 est à l'origine de certaines leucémies (O'Shea et al., 2002). Dans ce contexte génétique, les perte-de-fonction Stat5 ont un effet suppresseur sur les transformations provoquées par la protéine de fusion Tel-JAK2.

L'inactivation de JAK3 provoque chez l'Homme de graves immunodéficiences. L'analyse de souris *JAK3^{-/-}* a permis de caractériser cette immunodéficiences qui est due à l'absence de développement des lymphocytes T et des cellules NK.

Les souris déficientes *stat5a/b^{-/-}* se caractérisent par une absence de cellules Natural Killer, et des défauts de développement des lymphocytes B et T. Elles présentent également une faible densité cellulaire au niveau de la moelle osseuse et des études *in vitro* avec des précurseurs myéloïdes *stat5a/b^{-/-}* montrent qu'ils ont une survie limitée et sont incapables de proliférer (pour revue, (Hou et al., 2002).

Ces quelques exemples, en conjonction avec les données qui impliquent la voie JAK/STAT dans la production des hémocytes chez la drosophile, suggèrent une conservation de la fonction de la voie JAK/STAT dans les mécanismes hématopoïétiques au cours de l'évolution.

4. La voie Notch

Chez les mammifères, on dénombre quatre récepteurs Notch, qui interagissent avec les protéines de la famille Jagged/Delta. Le récepteur Notch1 est présent à la surface des précurseurs lymphoïdes communs aux cellules B et T, et de nombreuses études ont montré que Notch1 est un composant clef pour la spécification des lymphocytes T (pour revue, (Bartholdy and Matthias, 2004; Busslinger et al., 2000). En effet, l'activation de Notch1 dans les précurseurs lymphoïdes est nécessaire pour initier la lymphopoïèse T et assurer une première étape de différenciation des précurseurs en pro-cellules T. En absence de Notch1, la lymphopoïèse T s'arrête à une étape très précoce. En revanche le développement des cellules B n'est pas affecté. Le développement des lymphocytes T se déroule au niveau du thymus alors que les lymphocytes B se développent au niveau de la moelle osseuse. L'expression d'une forme active de Notch1 dans les cellules souches de la moelle osseuse suffit à les différencier en cellules T immatures, aux dépens du développement des cellules B dont la spécification se trouve inhibée. Au contraire, la délétion de *Notch1* promeut le développement des lymphocytes B dans le thymus. Au niveau moléculaire, il a été prouvé que cette inhibition est due à l'intervention de Notch1 qui interfère avec le facteur de transcription E47, dont l'activité est indispensable dans les premières étapes de la lymphopoïèse B.

5. Les voies Ras/Raf et VEGFR dans l'hématopoïèse des mammifères

Le facteur de croissance VEGF et son récepteur VEGFR-2 jouent un rôle prépondérant, aux premières étapes du développement embryonnaire. Ils stimulent la prolifération initiale des précurseurs mésodermiques communs aux lignées endothéliale et hématopoïétique, ainsi que leur migration vers les premiers sites de production hématopoïétique extra- et intra-embryonnaires. Les souris déficientes pour le gène *VEGFR-2*, l'un des trois récepteurs connus du VEGF, meurent précocément en raison de l'absence de différenciation d'îlots sanguins dans le sac vitellin, qui entraîne l'absence de cellules endothéliales et de cellules hématopoïétiques (Clauss, 2000).

La voie Ras/Raf est impliquée dans la régulation de la lymphopoïèse B à une étape précoce, à savoir la maturation des pré-pro-cellules B en pro-cellules B. Cette étape de transition peut être fortement ralentie par l'expression de dominants négatifs de Ras. Le développement normal de la lymphopoïèse peut être rétabli par l'expression d'une forme active de Raf-1, confirmant ainsi l'implication de la voie Ras/Raf dans ce processus (Iritani et al., 1997).

III. Les interactions hôtes-parasitoïdes chez la drosophile

Un objectif important de mon travail de thèse était l'identification de gènes requis dans les processus de différenciation des lamellocytes, en réponse à une infection parasitaire. L'étude de cette facette de la réponse immunitaire de la drosophile nécessite une connaissance précise des interactions qui se produisent entre l'hôte et son parasite lors d'une infection. Dans la première partie de ce chapitre, je présenterai des données générales sur le parasitisme chez les insectes. Ensuite j'exposerai des caractéristiques plus précises concernant les parasitoïdes Hyménoptères et les mécanismes de virulence qu'ils ont développé. Dans la dernière partie de ce chapitre, je présenterai plus particulièrement la guêpe endoparasitoïde *Leptopilina boulardi*, que nous utilisons au laboratoire pour parasiter nos larves de drosophile. Ces infections nous permettent d'étudier les processus de différenciation des lamellocytes, produits uniquement en réponse à ce type d'infestation.

A. Le parasitisme chez les Insectes

Le parasitisme est omniprésent. La plupart des espèces présentes sur notre planète sont parasitées au moins une fois au cours de leur vie. Les parasites sont des organismes qui exploitent

des ressources fournies par un autre individu non apparenté, appelé hôte. Les parasites ne tuent généralement pas leurs hôtes, même s'ils se développent à ses dépens. Étant donné que les ressources consommées par les parasites ne peuvent pas être utilisées par l'hôte pour ses fonctions vitales, c'est-à-dire la croissance, la survie et la reproduction, on assiste généralement à une réduction de la valeur sélective des hôtes parasités. Le parasitisme représente une contrainte sélective sur l'évolution des organismes hôtes, au même titre que la prédation ou la compétition.

L'évolution des parasites n'est pas indépendante de l'évolution de leurs hôtes. De nombreuses interactions hôtes-parasites ont convergé vers des processus de co-évolution qui, dans la plupart des cas, n'impliquent qu'une espèce hôte et une espèce parasite. Ce processus se traduit par l'émergence de mécanismes d'adaptation de la part de l'hôte lui permettant de se défendre contre l'infestation, et des contre-adaptations de la part du parasite lui permettant de contourner le système immunitaire de l'hôte.

Les mécanismes défensifs des hôtes parasités peuvent présenter plusieurs formes, actives ou passives. Parmi les défenses passives, les modifications du comportement permettent de minimiser l'impact du parasitisme sur la dynamique de la population. Par exemple, les femelles du grillon du foyer, *Acheta domesticus*, à la suite de l'injection d'une bactérie pathogène pondent le lendemain plus d'oeufs que des témoins sains. De façon similaire, certaines drosophiles modifient également leur comportement suite à des infections parasitaires. Les mâles de la drosophile *Drosophila nigros-piracula* infestés par l'acarien ectoparasite *Macrocheles subbadius* vivent moins longtemps que des mâles sains mais, avant leur mort, paradent plus et s'accouplent davantage (Michalakis and Hochberg, 1994; Thomas et al., 2000). D'autres espèces accélèrent leur développement pour avancer l'âge de la maturité sexuelle afin de limiter les effets d'une infestation par un parasite délétère.

Les mécanismes de défense actifs contre un parasite infectieux font appel au système immunitaire de l'hôte. Les insectes utilisent très largement des réactions d'encapsulation pour se défendre contre les parasites. Ces réactions d'encapsulation sont de deux types □ l'encapsulation cellulaire et l'encapsulation humorale (Carton et al., 2005). L'encapsulation humorale correspond au processus de mélanisation humorale que j'ai précédemment décrit. Au cours de l'encapsulation cellulaire, le parasite est isolé par les juxtapositions successives à sa périphérie de plusieurs couches d'hémocytes, la capsule cellulaire est ensuite mélanisée.

Un exemple précis de mélanisation humorale de parasite est bien connu chez le moustique *Anopheles gambiae*, qui est le principal vecteur du paludisme en Afrique. Le parasite *Plasmodium*,

responsable de la maladie, est transmis à l'homme lors de la piqûre d'un moustique femelle infecté. Certaines souches, au sein des populations de moustiques, sont capables de bloquer le cycle de *Plasmodium*. Dans ces souches dites réfractaires le développement des parasites est arrêté à la suite d'un processus d'encapsulation, où ce dernier est enfermé dans une matrice de mélanine. La résistance des moustiques du genre *Aedes* au nématode *Dirofilaria immitis*, un ver parasite qui s'installe dans les muscles thoraciques de l'hôte, est également assuré par les hémocytes qui se lysent à la surface du parasite pour libérer les enzymes de la mélanisation (Forton et al., 1985). Les hémocytes de *Aedes aegypti* expriment également la prophénoloxydase (Hillyer and Christensen, 2002). Dans le modèle d'infection moustique-nématode *Armigeres subalbatus-Brugia malayi*, l'implication des hémocytes dans l'encapsulation a également été étudiée. Le nombre d'hémocytes décroît fortement dans les 24h qui suivent une infection, ce qui correspond au temps nécessaire à l'encapsulation. Le niveau normal est ensuite rétabli dans les jours qui suivent (Guo et al., 1995).

B. Les Hyménoptères endoparasitoïdes et leurs hôtes

Un parasitoïde est un parasite qui se développe sur (ectoparasitoïde) ou dans (endoparasitoïde) un organisme hôte et provoque la mort de ce dernier. La mort de son hôte est un résultat direct ou indirect de son développement (Godfray, 2004). Contrairement aux parasites, il n'y a qu'une seule génération par hôte et seuls les stades immatures en sont dépendants. L'adulte a un mode de vie libre. Dans un grand nombre de cas, le parasitoïde et son hôte sont des insectes.

Le mode de vie parasitoïde représente entre 5 et 20% des espèces d'insectes (Godfray 1994). On retrouve des espèces ayant un mode de vie parasitoïde dans 6 ordres d'insectes: Hyménoptères, Coléoptères, Diptères, Neuroptères, Lépidoptères et Trichoptères. Cependant, ce sont les parasitoïdes Hyménoptères, Diptères et Coléoptères qui sont les plus nombreux. L'importance relative du mode de vie parasitoïde varie beaucoup d'un ordre à l'autre. L'ordre des Hyménoptères compte 67 000 espèces, dont environ 70% ont un mode de vie parasitoïde. C'est dans cet ordre que se retrouve la plus grande diversité de modes de vie et d'adaptations à différents hôtes et habitats.

Parmi les Hyménoptères, les guêpes endoparasitoïdes qui sont les mieux caractérisées appartiennent à la famille des Braconidés. Les guêpes braconides parasitent un éventail d'hôtes assez vaste allant des chenilles de Lépidoptères, aux larves de mouches, aux Coléoptères et aux pucerons, etc... Les femelles possèdent un ovipositeur à l'extrémité de leur abdomen, qu'elles

utilisent pour injecter les œufs dans les insectes. Après l'éclosion des œufs injectés dans l'hôte, les larves se nourrissent lentement de ce seul hôte. Au moment où son hôte meurt, la larve est parvenue à sa pleine croissance. Elle se nymphose à l'intérieur ou à proximité de l'hôte mort, quelquefois dans un cocon de soie, pour apparaître ensuite sous forme de guêpe adulte.

Les hyménoptères endoparasitoïdes ont développé au cours de l'évolution des stratégies leur permettant de se développer à l'intérieur d'un hôte immunocompétent. L'échec ou la réussite de l'infestation dépend des mécanismes de virulence développés par les espèces parasites, qui ont pour but de contourner le système immunitaire de l'hôte.

Une des stratégies de contournement les plus originales consiste à transmettre à l'hôte, au moment de l'oviposition des particules virales de type polydnavirus (PDV), dénommés bracovirus. Le génome viral des PDV est composé de plusieurs molécules d'ADN intégrées au génome de la guêpe parasitoïde. Ces virus permettent aux parasitoïdes de moduler la physiologie de leur hôte et de le rendre propice à leur propre développement. Les particules virales sont produites dans les ovaires de la femelle parasitoïde après excision et circularisation des molécules.

Un tel exemple de mécanisme immunosuppresseur est utilisé par la guêpe *Cotesia congregata* qui doit, pour se perpétuer, pondre ses œufs dans la chenille du sphynx du tabac *Manduca sexta*. Au cours de ce parasitisme, la guêpe injecte 50 à 150 œufs endoparasites à l'intérieur de son hôte (Amaya et al., 2005), ainsi que des bracovirus. Les gènes viraux portés par ces virus codent une série de protéines qui sont produites dans les tissus de la chenille parasitée. Le séquençage et l'analyse du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* ont été réalisés (Espagne et al., 2004). L'existence de plusieurs familles multigéniques a été mise en évidence, avec notamment des gènes codant des protéines tyrosines phosphatases, des cystatines, et des inhibiteurs de protéases à cystéine (Espagne et al., 2004; Provost et al., 2004). Ces protéines virales jouent un rôle essentiel à la réussite parasitaire. En effet, leur expression entraîne une dérégulation des systèmes physiologiques et endocriniens à l'origine d'un blocage du développement au stade pupal, et de la mort par apoptose des hémocytes.

C. La relation hôte-parasitoïde *Drosophila melanogaster*–*Leptopilina boulardi*

Les drosophiles sont les cibles de nombreuses espèces de guêpes endoparasites, de l'ordre des Hyménoptères, telles que *Leptopilina* et *Asobara*, qui sont les plus étudiées (Figure 11). Les femelles pondent les œufs à l'intérieur de la cavité de jeunes larves de drosophile. L'introduction

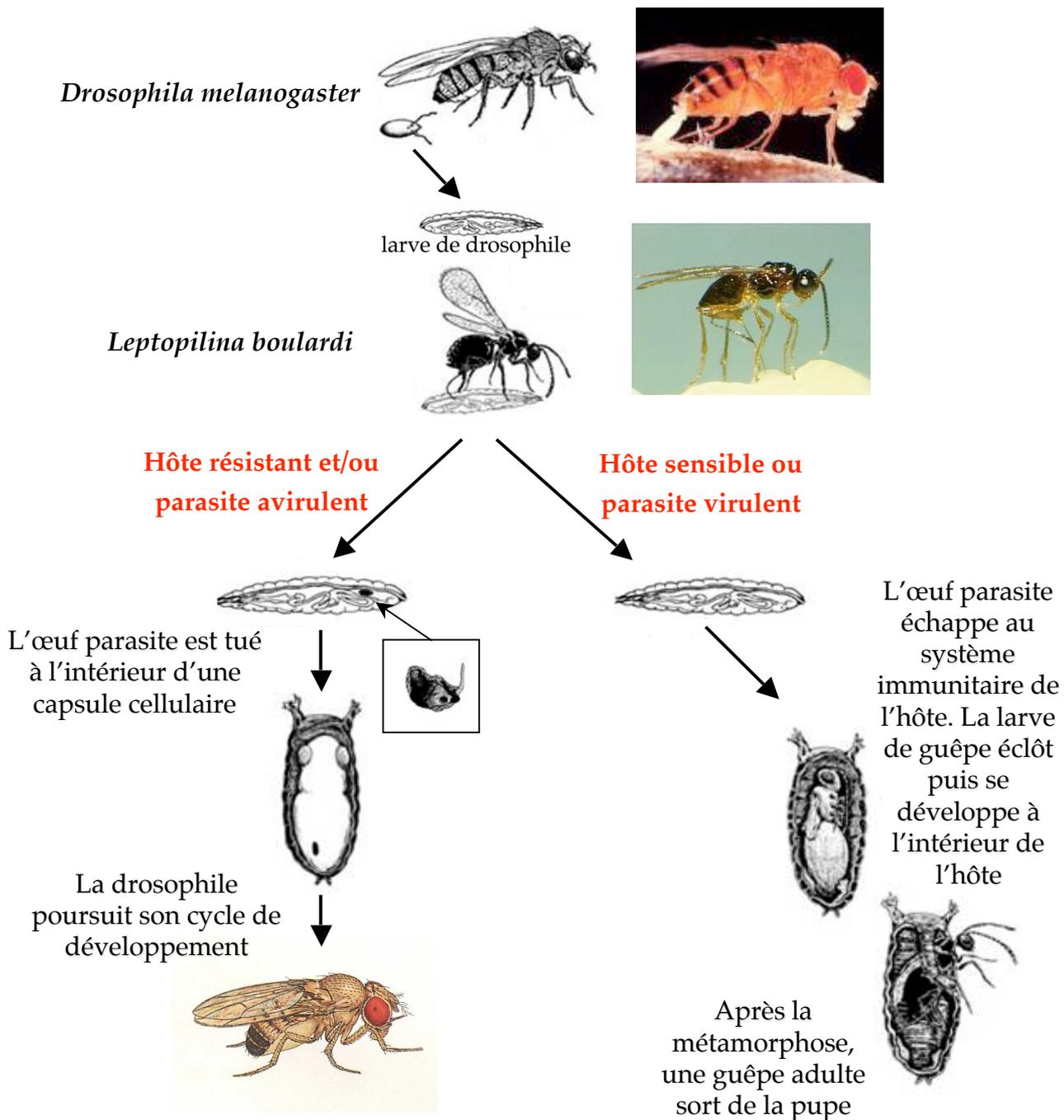


Figure 11: Le parasitisme de *Drosophila melanogaster* par *Leptopilina boulardi*.

L'Hyménoptère endoparasitoïde *L. boulardi* pond ses œufs dans l'hémocoèle de jeunes larves de drosophile. Les larves de souches résistantes éliminent le parasite dans une capsule cellulaire qui est mélanisée. Cette capsule inerte ne gêne pas le développement de la drosophile et persiste au stade adulte. L'encapsulation échoue lorsque les larves de drosophiles sensibles sont infectées, où lorsque le parasitoïde provient d'une souche virulente. Dans ce cas, la larve de guêpe éclôt puis se développe à l'intérieur de l'hôte. La larve de drosophile entre en métamorphose mais meurt avant d'achever son cycle. Finalement, une guêpe adulte sort de la puppe.

de ce corps étranger dans l'hémocoèle de la larve est détectée par son système immunitaire, lequel initie la production de cellules spécialisées dans l'encapsulation, les lamellocytes. Chez les larves résistantes, on assiste alors à l'encapsulation cellulaire de l'œuf de guêpe. La capsule ainsi formée autour du parasite est mélanisée, conduisant à la mort de l'intrus. Chez les larves sensibles, les lamellocytes échouent dans les processus d'encapsulation, l'œuf éclot et la larve de guêpe se développe à l'intérieur de la cavité de la drosophile. Au moment de la métamorphose de l'hôte, celui-ci meurt permettant à la larve de guêpe de se métamorphoser à l'intérieur de la puppe de drosophile, d'où elle sortira au stade adulte.

Toutes les souches de *D. melanogaster* ne répondent pas avec la même efficacité aux infections parasitaires. Un facteur génétique contrôlant cette résistance/sensibilité des drosophiles aux infections par la guêpe *Leptopilina boulardi* a été mis en évidence. Ce gène est appelé *Rlb* (pour *Resistance to L. boulardi*), il existe sous deux formes alléliques, l'allèle résistant étant dominant (Carton and Nappi, 1997). Ce gène de résistance n'appartient pas à un mécanisme de défense général contre tous les Hyménoptères parasitoïdes puisque la résistance contre *Asobara tabida*, une autre guêpe parasitoïde du même groupe, dépend du gène de résistance *Rat* (Benassi et al., 1998; Carton and Nappi, 2001; Hita et al., 1999; Poirie et al., 2000). Ces études ont mis en évidence l'existence d'au moins deux systèmes de protection distincts, contre les infestations par les guêpes endoparasitoïdes, codés dans le génome de la drosophile.

L'efficacité parasitaire ne dépend pas uniquement de la résistance/sensibilité des souches de drosophiles face aux parasites, mais dépend également de la virulence des souches de guêpes infestantes. Bien que la plupart des souches de *Leptopilina boulardi* soient virulentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'inhiber la réponse immunitaire de l'hôte, certaines souches dites avirulentes, contournent les réactions d'encapsulation avec une efficacité plus faible. La virulence du parasite *L. boulardi* est sous le contrôle génétique d'un gène majeur, codé dans son génome. Ce gène de virulence contre *D. melanogaster* est noté Is_m (*Immune suppressive*) avec deux allèles, Is_m^+ pour les souches virulentes et Is_m^- pour les souches avirulentes (Carton and Nappi, 2001).

L. boulardi, comme de nombreuses espèces Braconides, injecte des facteurs immunosuppresseurs lors de l'oviposition pour contourner le système immunitaire de l'hôte. Des études ont révélé la présence de particules de type viral (VLP pour Virus Like Particles) dans les substances injectées lors des pontes par les femelles de souches virulentes de *L. boulardi* (Russo et al., 2001). Ces particules ne correspondent pas à des bracovirus, ils sont considérés comme des virus défectueux dont le génome, intégré dans celui de la guêpe, n'est pas enveloppé dans les nouveaux virions (Labrosse et al., 2003). L'injection de ces particules est associée à un

changement de morphologie des lamellocytes qui deviennent bipolaires et qui ont probablement modifié leurs propriétés adhésives. Ces VLP auraient donc pour effet de bloquer les mécanismes d'encapsulation (Nappi et al., 2004).

Des études récentes ont mis en évidence, chez les souches virulentes *Ism*⁺, un facteur de virulence (P4) produit dans la glande à venin de l'hyménoptère (Labrosse et al., 2005), reliée à son système génital. Ce facteur, injecté dans l'hôte au moment de la ponte, induit une modification de la morphologie des lamellocytes. La caractérisation de ce facteur de virulence a montré qu'il s'agit d'une protéine de la famille Rho-GAP (Ras homologous GTPase Activating Protein), une famille de protéines connue pour son rôle régulateur des RhoGTPases. Le mode d'action du facteur P4 n'est pas caractérisé à ce jour. Cependant, les RhoGTPases étant des acteurs importants de la dynamique du cytosquelette, il est possible que le facteur P4 inhibe les réactions d'encapsulation en agissant sur le cytosquelette et la dynamique des lamellocytes.

IV. Objectif de ce travail

Au cours de mon travail de thèse, j'ai développé trois projets étroitement liés. Le premier projet, que je présenterai dans le premier chapitre, avait pour but d'explorer l'activité transcriptionnelle des hémocytes de la drosophile, afin d'enrichir nos connaissances moléculaires sur les différentes fonctions exercées par les cellules sanguines. Nous avons analysé l'activité transcriptionnelle des hémocytes par la technique des puces à ADN Affymetrix, qui permet de «mesurer» individuellement la transcription des 13000 gènes de la drosophile. Nous avons imaginé une stratégie qui permet, par recoupement des données obtenues à partir de plusieurs échantillons distincts, d'allouer à un type hémocytaire une activité génétique caractéristique. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la contribution des hémocytes aux mécanismes de l'immunité innée (encapsulation, phagocytose et mélanisation), en analysant l'activité transcriptionnelle des hémocytes de larves mutantes et de larves infectées par un mélange bactérien.

Le deuxième chapitre des résultats sera consacré au facteur Collier, l'unique orthologue chez la drosophile du facteur EBF (Early B-cell Factor) des mammifères, et au décryptage de son rôle dans les processus hématopoïétiques de la drosophile. Ce projet a débuté avec l'observation, par l'équipe du Dr Alain Vincent (UMR 5547, Toulouse), que le gène *collier* est exprimé très tôt au cours de l'embryogenèse dans la glande de la lymphe. Nous avons démontré que l'activité du

gène *collier* est indispensable à la différenciation des lamellocytes, identifiant le premier facteur de transcription requis pour ce processus. Nous avons mis en évidence une similitude supplémentaire entre le système hématopoïétique de la drosophile et celui des mammifères, où EBF est un facteur clef contrôlant la différenciation précoce des lymphocytes B (Dubois and Vincent, 2001; Lin and Grosschedl, 1995). Suite à ces travaux, nous avons proposé un modèle pour la spécification des lamellocytes suite à une infection parasitaire.

Nous avons cherché à valider ce modèle en identifiant d'autres gènes requis pour la spécification des lamellocytes. Dans ce but, plusieurs approches ont été mises en œuvre, parmi lesquelles l'étude, par la technique des puces à ADN Affymetrix, de l'activité transcriptionnelle d'organes hématopoïétiques surexprimant *collier*. Cette stratégie nous a permis d'identifier un gène jusque-là non caractérisé, annoté *CG14225* dans les bases de données, qui code une protéine transmembranaire putative homologue des récepteurs IL-6R/gp130 des mammifères (Hombria and Brown, 2002). Je présenterai dans le troisième chapitre les résultats des études menées sur ce récepteur candidat et les différentes approches envisagées pour étudier son implication dans les processus hématopoïétiques de la drosophile.

-RESULTATS-

CHAPITRE I

Analyse de l'activité transcriptionnelle des hémocytes de la drosophile

Analyse de l'activité transcriptionnelle des hémocytes de la drosophile

I. Introduction

Les approches traditionnelles pour l'analyse des expressions géniques d'un échantillon biologique ne nous permettent d'examiner l'expression que d'un nombre limité de gènes par expérience. En revanche, la technologie récente des puces à ADN permet une mesure simultanée du niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes voire d'un génome entier, dans des dizaines de conditions différentes, physiologiques ou pathologiques. Son utilité est scientifiquement incontestable car la connaissance du niveau d'expression d'un gène dans ces différentes situations constitue une avancée vers sa fonction.

Chez les mammifères, l'utilisation des puces à ADN appliquée à l'hématopoïèse a permis la définition des profils d'expression caractéristiques des différents stades de différenciation des cellules sanguines. Ces profils d'expression déterminent des « signatures moléculaires », et les variations des profils peuvent définir le programme génétique suivi par les cellules. Ainsi, une équipe américaine a défini la signature moléculaire des cellules souches hématopoïétiques de souris. Elle correspond à l'expression combinatoire d'un ensemble de gènes dont les transcrits se trouvent enrichis au sein des cellules souches alors qu'ils sont soit absents, soit peu exprimés, dans les cellules différenciées qui en dérivent (Ivanova et al., 2002).

Cette technique est également utilisée chez les mammifères pour l'étude des processus immunitaires (innés et adaptatifs), avec de nombreuses applications possibles, telles par exemple la compréhension des dérégulations à l'origine des cancers ou des maladies auto-immunes (van der Pouw Kraan et al., 2004). Dans ce dernier cas, les « lymphochips » regroupent les informations d'expression de près de 18 000 gènes. Ces gènes sont ceux préférentiellement exprimés dans les cellules lymphoïdes, et ceux impliqués ou suspectés de l'être dans les mécanismes immunitaires et cancéreux.

Les puces à ADN Affymetrix ont été utilisées préalablement par notre laboratoire, ainsi que d'autres, pour l'analyse transcriptionnelle globale de la réponse immunitaire innée de la drosophile. Ces travaux ont démontré l'efficacité de cette technique, par la quantité et la spécificité des informations recueillies. A titre d'exemple, les puces à ADN ont révélé que les voies *Toll* et *imd* régulent la transcription de plus de 600 gènes après une infection, autant de gènes qui peuvent jouer un rôle dans la réponse immunitaire de la drosophile (De Gregorio et al., 2001; De Gregorio

et al., 2002b; Irving et al., 2001). Cependant, cette technique n'avait jamais été appliquée à l'étude des hémocytes de drosophiles. Dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les mécanismes de prolifération et de différenciation, ou contribuant aux diverses fonctions hémocytaires, nous avons analysé les activités transcriptionnelles de populations d'hémocytes provenant de plusieurs types d'échantillons biologiques.

De façon similaire aux études transcriptionnelles des cellules hématopoïétiques de mammifères, nous avons tenté d'allouer à chaque type hémocytaire un profil d'expression qui le caractérise, sans pour autant parler de «signature moléculaire». Un des objectifs de cette étude transcriptomique était l'identification de marqueurs spécifiques pour chaque type hémocytaire. En effet, alors que les cellules sanguines des mammifères et leur stade de différenciation peuvent être facilement identifiés par l'expression de nombreux marqueurs de surface, nous ne disposons que de peu de marqueurs spécifiques pour les hémocytes de drosophile, ce qui représente un inconvénient majeur pour l'étude de ces cellules. Nous avons recherché des indications sur les gènes impliqués dans les fonctions des différents types hémocytaires. Notre intérêt s'est également porté sur la contribution des hémocytes aux mécanismes de défense immunitaire, qui reste encore mal définie, en analysant les profils d'expression des hémocytes de larves ayant subi une infection bactérienne.

L'article I présente les travaux que nous avons effectués.

II. Article I □ New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis.

**“New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions
through genome-wide analysis”**

Phil Irving*, Jean-Michel Ubeda*, Daniel Doucet*, Laurent Troxler, Marie Lagueux, Daniel Zachary, Jules A. Hoffmann, Charles Hetru and Marie Meister.

(* □ ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail)

Cellular Microbiology (2005) 7(3), 335-350

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

New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis

Phil Irving*, **Jean-Michel Ubeda***, Daniel Doucet*, Laurent Troxler, Marie Lagueux, Daniel Zachary, Jules A. Hoffmann, Charles Hetru and Marie Meister

(*: ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail)

Cellular Microbiology, 2005, Volume 7, N° 3, Pages 335 - 350

Pages 335 – 350 :

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.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x>

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

III. Résumé

Nous avons analysé les expressions géniques de plusieurs échantillons hémocytaires, prélevés à partir de l'hémolymphe de larves de drosophile, dans différents contextes génétiques. Nous avons ainsi mesuré et comparé les activités transcriptionnelles des hémocytes de larves sauvages à celles de larves portant des mutations qui provoquent des dérégulations du système hématopoïétique. Ces dérégulations étaient choisies pour leur effet sur la prolifération et/ou la différenciation des cellules sanguines. En recoupant les données obtenues sur les puces et en tenant compte des compositions relatives des différents échantillons, nous avons défini les transcrits qui sont préférentiellement enrichis dans chaque type d'hémocytes.

La comparaison des niveaux d'expression dans les différents échantillons permet également de détecter les gènes qui sont régulés différemment en fonction du contexte génétique. Ces modifications d'expression peuvent, dans certains cas, traduire une fonction pour ce gène dans les processus d'hématopoïèse ou bien dans les fonctions des hémocytes. Enfin, pour analyser la contribution des hémocytes aux mécanismes de défense immunitaire, nous avons mesuré les activités transcriptionnelles des hémocytes suite à une infection bactérienne.

Parmi les 13000 gènes représentés sur les puces à ADN Affymetrix, plus de 5000 gènes présentant un niveau significatif d'expression ont été détectés dans au moins un des échantillons hémocytaires. Parmi ceux-ci, 2517 gènes présentent une activité transcriptionnelle significativement enrichie dans les hémocytes (indice d'expression augmenté de deux fois au minimum) par rapport aux larves entières qui ont servi de contrôle, ce qui représente une quantité élevée pour un seul tissu. 423 transcrits sont communs à tous les échantillons hémocytaires. Ils représentent aussi bien des gènes exprimés de façon pan-hémocytaire que des gènes exprimés dans les plasmacytes, puisque ces derniers sont présents dans tous les échantillons. Nous retrouvons dans ce groupe les transcrits de gènes ayant des rôles connus dans les processus hématopoïétiques chez la drosophile, ou dans les fonctions des hémocytes. A titre d'exemple, des expressions significatives sont détectées pour les gènes *serpent*, indispensable à la fois dans le développement et les fonctions des hémocytes, *stat92E*, le transactivateur de la voie JAK/STAT, mais également *PVR*, *dSR-CI* et *croquemort*. Nous retrouvons également des gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire comme la Peroxydasine, le Collagène, l'Hémolectine.

L'expression de nombreux transcrits jusque-là non décrits dans les hémocytes a été mise en évidence. Ces transcrits codent des molécules d'adhésion cellulaires, des intégrines, des lectines, des facteurs de croissance, ou encore des protéases à sérine.

Les hémocytes sont apparus comme des acteurs importants de la facette humorale de l'immunité innée. Outre le fait que la voie Toll soit active dans les hémocytes et qu'ils expriment fortement certains peptides antimicrobiens suite à une infection, nous avons observé que les hémocytes expriment plusieurs gènes codant des PGRPs et des GNBPs. D'un intérêt particulier, PGRP-SA, un récepteur clef dans la détection des bactéries à Gram positif en amont de la voie Toll, est principalement produit par les hémocytes.

Nous avons également observé que le gène *spätzle* est exprimé dans les hémocytes et que sa transcription est fortement augmentée dans ces cellules suite à une infection. Cependant, le transcrit *spz* est quasiment indétectable dans les larves contrôles, et nous avons mesuré par des analyses complémentaires que le gène *spz* n'était pas significativement induit dans le corps gras. Nos résultats démontrent ainsi de façon claire que le gène *spz* n'est pas une cible de la voie Toll dans les cellules du corps gras larvaire. La production de Spz par les hémocytes après une infection pourrait correspondre à la remise à niveau de son taux en circulation, sous forme d'un propeptide prêt à être coupé pour devenir fonctionnel lors d'une infection ultérieure.

Nous avons pu apporter des informations nouvelles sur le mécanisme d'encapsulation. En effet, nous avons montré que la formation des capsules par les lamellocytes requiert la fonction des intégrines, ce qui n'avait jamais été démontré *in vivo*. Les intégrines sont formées par la dimérisation de deux sous-unités □ et □. Les données obtenues nous ont permis de démontrer que la sous-unité □PS codée par le gène *myspheroid* est indispensable pour la formation de la capsule. De plus, nous avons identifié la sous-unité □PS4 comme un marqueur spécifique des lamellocytes. Ces indications nous suggèrent que le dimère formé par les deux sous-unités □PS/□PS4 contribue à la cohésion structurelle des capsules formées par les lamellocytes.

Nous avons montré également que l'un des trois gènes codant une Prophénoloxydase, *proPO59*, est exprimé non pas dans les cellules à cristaux comme les deux autres gènes, mais spécifiquement dans les lamellocytes. Cette caractéristique inattendue permet aux lamellocytes de participer directement à la mélanisation de la capsule qu'ils forment, et nous fournit, en plus de □PS4, un marqueur spécifique des lamellocytes.

IV. Discussion

Les analyses que nous avons effectuées ne nous permettent pas de définir des signatures moléculaires qui caractériseraient les prohémyocytes et les différents types d'hémocytes différenciés. En effet, l'inconvénient majeur de notre stratégie d'analyse est qu'aucun des échantillons testés n'est composé d'un seul type de cellules sanguines, ce qui nous aurait permis d'analyser spécifiquement les expressions géniques d'un type hémocytaire précis. Il nous était impossible à l'époque de nous affranchir de cet inconvénient puisqu'aucune technique permettant la récolte et le tri différentiel des hémocytes n'était décrite. Récemment, la méthode de séparation par cytométrie « \square ACS \square (Fluorescence activated cell sorting) a été adaptée au tri des hémocytes de la drosophile (Tirouvanziam et al., 2004). Cette méthode permet la séparation d'hémocytes fraîchement prélevés, et leur assortiment en populations homogènes, permettant par la suite des études *ex vivo*. Bien qu'elle ne soit applicable pour le moment qu'à de très petits échantillons, le développement de cette technique permettrait de nombreuses avancées dans l'étude fonctionnelle et transcriptionnelle des hémocytes de drosophile.

Il est à remarquer que les transcrits de nombreux gènes ayant des fonctions établies dans l'hématopoïèse de la drosophile, tels que *Notch*, *Serrate*, *gcm*, *lozenge*, *hopscotch*, *Raf*, etc, n'ont pas été détectés dans nos échantillons. Cette observation pousse à la réflexion. Il est en effet possible que les niveaux d'expression de ces gènes soient trop faibles pour être détectés par notre analyse et que ceci reflète les limitations techniques de notre approche. Il est aussi possible que certains gènes ne soient exprimés que de façon transitoire pour assurer leur fonction. Nous pouvons également imaginer que certains de ces gènes sont exprimés par un nombre limité de cellules, ce qui est le cas pour *Serrate* par exemple, ce qui résulte en une trop grande dilution des transcrits dans nos préparations d'ARNs.

Dans une étude récente (Johansson et al., 2005), les auteurs ont analysé les activités transcriptionnelles des cellules *mbn-2* suite à un traitement au LPS ou par la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli*. Ces cellules en culture dérivent de macrophages de drosophile et ont gardé leur capacité de phagocytose, ainsi que celle de répondre aux infections microbiennes en produisant des peptides antimicrobiens *via* les voies de signalisation intracellulaires Rel/NF- \square B. Des études avaient démontré que les cellules *mbn-2* répondent à un stimulus immun au LPS (Samakovlis et al., 1992). Il est cependant important de noter que le LPS n'est pas un inducteur de la réponse immunitaire chez les mouches adultes, et que l'activation des voies de signalisation Rel/NF- \square B dans les cellules *mbn-2* est très certainement causée par la contamination des

préparations commerciales de LPS avec des peptidoglycanes (Leulier et al., 2003). Notre approche fut différente dans le sens où nous avons utilisé, pour les mesures d'expression sur les puces à ADN, des hémocytes prélevés *in vivo* chez des larves préalablement infectées par un mélange bactérien. Néanmoins ces deux travaux partagent un objectif commun qui est l'analyse des régulations transcriptionnelles qui s'opèrent lors de la réponse immunitaire dans les hémocytes. Ainsi, en comparant les données que nous avons obtenues avec celles de Johansson et collaborateurs, nous trouvons un certain nombre de résultats concordants, c'est-à-dire que certains gènes sont induits de façon similaire dans les deux études. C'est le cas par exemple des gènes *PGRP-SA*, *PGRP-SB1* et *Tep4* qui sont fortement induits après infection. Cependant, de nombreux exemples d'effets inverses sur les régulations transcriptionnelles sont remarqués. Par exemple, les gènes de la voie JAK/STAT *dome*, *upd2* et *upd3*, qui ne sont pas détectés sur nos puces ont une transcription augmentée dans les cellules *mbn-2* après un stimulus bactérien. Un autre exemple marquant concerne le récepteur scavenger dSR-CI. Son expression est fortement augmentée dans nos puces suite à une infection bactérienne, alors qu'il ne subit aucune modification d'expression dans les cellules *mbn-2* sous l'effet de LPS et des bactéries *E. coli*. Ces observations mettent bien en évidence les disparités qui peuvent exister entre des études *in vitro* et les études *in vivo*. En effet, les cellules *mbn-2* présentent certaines caractéristiques des plasmocytes/macrophages des drosophiles, mais en ont perdu d'autres. Les études *in vivo* se basent, elles, sur des cellules prélevées directement dans leur milieu physiologique avec lequel elles ont de nombreuses interactions.

Bien que les puces à ADN représentent une technique très efficace pour l'identification des gènes qui sont induits ou réprimés en réponse à une infection microbienne, elle ne permet pas d'identifier les protéines qui subissent des régulations au niveau traductionnel ou post-traductionnel. Ces régulations peuvent être analysées par une approche protéomique. Une étude récente a analysé le protéome des cellules *mbn-2* de drosophile et ses modifications suite à un traitement au LPS (Loseva and Engstrom, 2004). Les auteurs ont mis en évidence que des modifications très rapides du protéome apparaissent suite au traitement. Je citerai à titre d'exemple les protéines du cytosquelette impliquées dans la phagocytose, des protéines de transport nucléaire et des régulateurs transcriptionnels pour la transcription de gènes cibles, des protéases sécrétées sous la forme de zymogènes inactifs, qui doivent subir une coupure protéolytique pour être activées. Ces protéines sont ainsi activées au niveau post-traductionnel, et leurs transcrits ne sont pas forcément affectés par un stimulus immun. Les études protéomiques et transcriptomiques des hémocytes de la drosophile, ou des lignées cellulaires qui en dérivent, sont ainsi complémentaires car elles procurent deux perspectives différentes des activités cellulaires.

Notre travail a permis l'établissement du transcriptome des hémocytes larvaires de la drosophile, ce qui nous permet aujourd'hui d'avoir une idée plus précise et plus étendue des fonctions qui peuvent y être associées. Nous avons pu associer des familles de gènes à des types cellulaires précis et identifier ainsi des marqueurs spécifiques. L'ensemble des voies de signalisation actives dans les hémocytes pose la question de connaître leur implication dans les différents processus comme la phagocytose, l'encapsulation et la mélanisation ou dans d'autres mécanismes comme la prolifération et la différenciation. En ce sens, nous avons établi une banque d'informations qui servira comme base de référence pour les études futures sur les cellules sanguines de la drosophile.

CHAPITRE II

Etude du facteur Collier dans le développement hématopoiétique de la drosophile

Étude du facteur Collier dans le développement hématopoïétique de la drosophile

I. Introduction

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai commencé mon travail de thèse par la recherche d'un rôle potentiel du facteur Collier dans les processus hématopoïétiques de la drosophile. Collier (Col) est un facteur de transcription. Il est l'unique orthologue chez la drosophile de EBF (Early B-cell Factor) des mammifères, un acteur clef du développement des lymphocytes B (Figure 12A). Durant la lymphopoïèse B, les précurseurs lymphoïdes subissent plusieurs étapes de différenciation et des facteurs de transcription, agissant de façon successive, contrôlent les étapes intermédiaires de ce processus. Les facteurs EBF et E2A agissent de concert très tôt au cours de cette différenciation. EBF n'est pas requis dans les précurseurs lymphoïdes pour initier le programme de différenciation des lymphocytes B, il agit en rendant les cellules compétentes à poursuivre ce programme. Son activité est indispensable pour assurer la maturation des pro-cellules B en pré-cellules B (Bartholdy and Matthias, 2004; Busslinger et al., 2000). Ainsi, des souris KO *ebf*^{-/-} sont complètement dépourvues de lymphocytes B différenciés (Lin and Grosschedl, 1995) et les précurseurs lymphoïdes restent bloqués à un stade précoce de leur développement. EBF et E2A régulent l'expression de nombreux gènes de la lymphopoïèse B, notamment *Pax5* qui code un troisième transactivateur, et dont l'activité est tout aussi cruciale au bon déroulement de ce processus. L'expression forcée des facteurs E2A et EBF dans les précurseurs hématopoïétiques suffit à déclencher le programme entier de différenciation et de maturation des lymphocytes B (O'Riordan and Grosschedl, 1999).

Les facteurs EBF et Col appartiennent à une famille de protéines caractérisées par un domaine de liaison à l'ADN de 210 acides aminés renfermant une structure en doigt de zinc. Ce domaine est associé à un motif HLH et à une région de 135 acides aminés hautement conservés qui recouvre en partie les motifs HLH (Figure 12B). EBF, Col, et Olfactory1 identifié chez le rat, sont les trois membres de cette famille de facteurs transcriptionnels, appelé COE (Crozatier et al., 1996; Dubois and Vincent, 2001) Les facteurs EBF et Col présentent une importante conservation de séquence.

Col a été identifié chez la drosophile pour son rôle au cours du développement embryonnaire, où il contrôle la formation de certains segments de la tête. Au stade blastoderme,

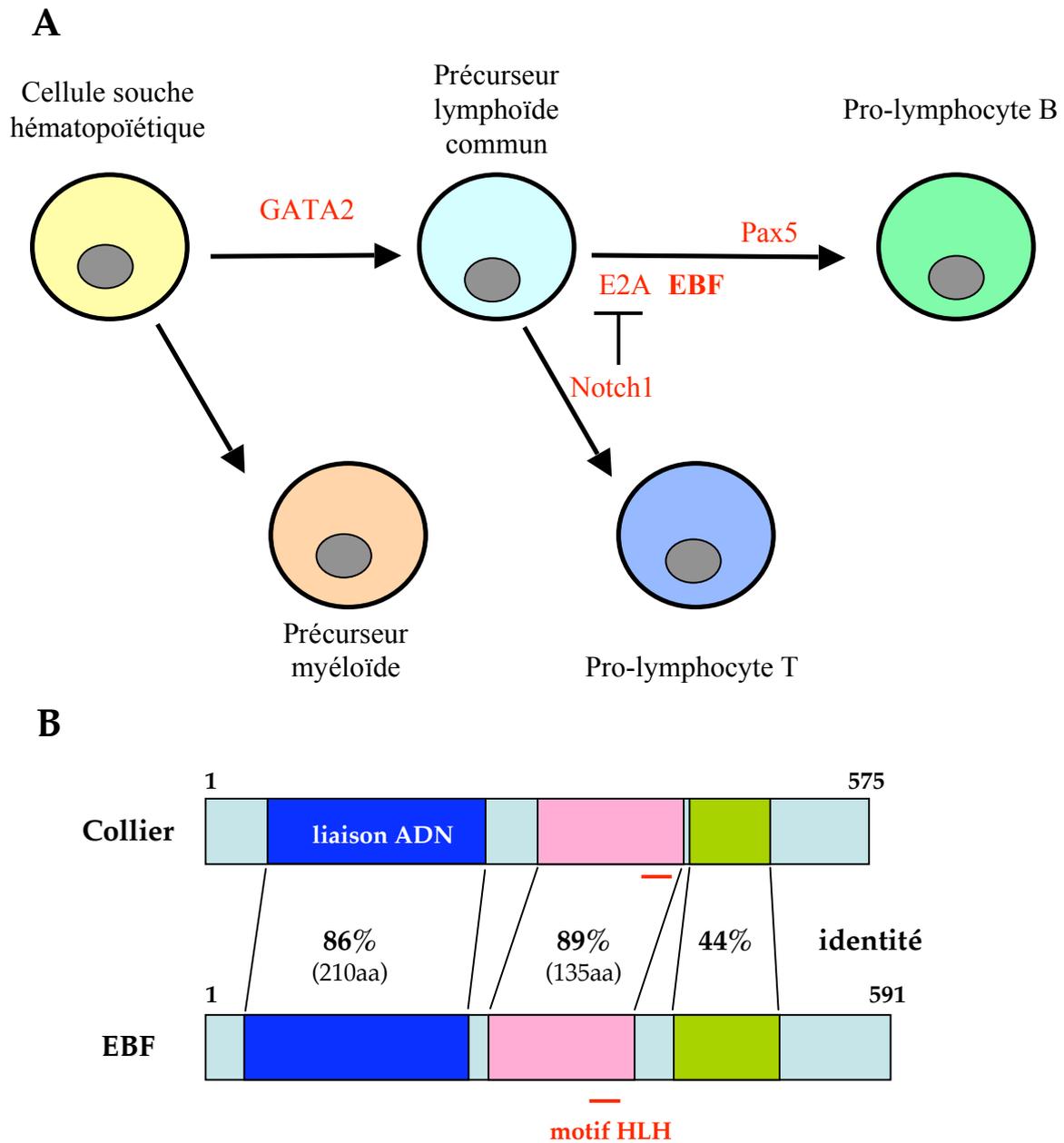


Figure 12 : Collier est l'orthologue de EBF chez la drosophile.

(A) EBF est un transactivateur clef de la lymphopoïèse B, il est impliqué dans la hiérarchie transcriptionnelle contrôlant la différenciation des pro-lymphocytes à partir de précurseurs lymphoïdes communs. (B) L'alignement entre EBF et Collier montre une grande identité de séquence dans les domaines de liaison à l'ADN, et dans une deuxième région de 135 acides aminés qui englobe le motif HLH.

col est exprimé par les cellules du «Single mitotic domain» MD2 et chevauche en partie les primordia des segments mandibulaires et intercalaires (parasegment 0). Lors de la gastrulation, Col est requis pour une différenciation correcte de ces structures (Crozatier et al., 1996). En plus de son rôle dans la segmentation de la tête, le facteur Col est nécessaire à la spécification des muscles somatiques embryonnaires DA3 (Crozatier et al., 1999) et contribue à la formation de l'aile en contrôlant la taille du compartiment postérieur. Cette fonction implique la spécification de la veine L4 et l'organisation de la région interveines L3-L4 (Crozatier et al., 2002; Mohler et al., 2000).

Le Dr Michèle Crozatier (UMR 5547, Toulouse, dirigé par le Dr Alain Vincent) en étudiant le profil d'expression de *col* chez l'embryon de drosophile avait observé par des hybridations *in-situ*, ainsi que par immunolocalisation, deux groupes de cellules marquées localisées dans la région dorsale en fin d'embryogenèse. Il est apparu par la suite que ces cellules correspondent aux précurseurs de la glande de la lymphe, l'organe hématopoïétique larvaire. Suite à ces observations, M. Crozatier et ses collaborateurs ont voulu savoir si Col jouait un rôle dans la réponse immunitaire et/ou dans l'hématopoïèse de la drosophile. La réponse humorale des mutants *col* aux infections microbiennes a été testée et aucun défaut de résistance n'a pu être observé (M. Crozatier, communication personnelle). Les voies Toll et IMD sont normalement activées, Col n'est vraisemblablement pas impliqué dans la réponse humorale de la drosophile. Dans un travail de collaboration entre l'équipe toulousaine et notre équipe au laboratoire, nous avons recherché un phénotype hématopoïétique chez les mutants *col*, afin de caractériser un rôle éventuel de ce facteur dans les processus de prolifération et/ou de différenciation des hémocytes de la drosophile.

II. Article II Cellular Immune Response to Parasitization in *Drosophila* Requires the EBF Orthologue Collier

**“Cellular Immune Response to Parasitization in *Drosophila*
Requires the EBF Orthologue Collier”**

Michèle Crozatier*, Jean-Michel Ubeda*, Alain Vincent, Marie Meister.
(*Ces auteurs ont contribué à parts égales dans ce travail)

PLoS Biology 2004 Aug;2(8):E196

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

Cellular Immune Response to Parasitization in *Drosophila* Requires the EBF Orthologue Collier

Michèle Crozatier*, **Jean-Michel Ubeda***, Alain Vincent, Marie Meister

(*: ces auteurs ont contribué à parts égales dans ce travail)

PLoS Biology, 2004, Volume 2, N°8, Pages 1107-1113

Pages 1107-1113 :

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://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-archive&issn=1545-7885&year=2004>

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

III. Résumé

- Col est exprimé par une sous-population cellules hématopoïétiques.

La première expression de Col dans les tissus hématopoïétiques est détectée assez tôt au cours du développement embryonnaire (stade 11), dans les précurseurs de la glande de la lymphé au niveau du mésoderme latéral. Col représente le marqueur le plus précoce pour les territoires présomptifs de la glande de la lymphé chez l'embryon. En fin d'embryogenèse, alors que ces primordia ont migré dorsalement pour se positionner le long du vaisseau dorsal, seules quelques cellules situées postérieurement dans l'organe en formation continuent à exprimer Col fortement. Ces cellules préfigurent le centre signalisateur postérieur (PSC) puisqu'au cours de l'hématopoïèse larvaire, à l'arrière des lobes antérieurs de la glande de la lymphé, seules les cellules du PSC expriment Col. Le PSC avait été préalablement identifié par une équipe américaine (Lebestky et al., 2003) qui avait proposé un rôle instructif des cellules du PSC pour le développement des cellules à cristaux. L'identification du PSC était basée sur le domaine d'expression de Serrate, Col constitue ainsi le deuxième marqueur pour les cellules du PSC au stade larvaire. Les prohémyocytes contenus dans les lobes antérieurs n'expriment pas Col, ce qui n'est pas le cas dans les lobes postérieurs où Col est exprimé par un nombre variable de prohémyocytes.

Bien que Col soit exprimé relativement tôt dans la glande de la lymphé, sa fonction n'est pas requise pour la spécification et la formation de cet organe au stade embryonnaire. Cependant les cellules du PSC ne peuvent se différencier chez les larves mutantes *col*.

- La fonction de *col* est indispensable à la différenciation des lamellocytes

La perte-de-fonction *col* est associée à une déficience de spécification des lamellocytes en réponse à une infection parasitaire par *Leptopilina boulardi*. Col est ainsi un facteur indispensable au programme de différenciation de ces cellules. Ce rôle de Col est confirmé par la mise en évidence que le destin lamellocyte peut être forcé dans les prohémyocytes par la surexpression de *col* de façon ectopique à l'aide d'un pilote pan-hématopoïétique. Cette surexpression entraîne la différenciation massive des lamellocytes en absence de toute infection.

Cependant, nous avons montré que les cellules Col⁺ ne sont pas les précurseurs directs des lamellocytes, puisque le profil d'expression de Col ne change pas suite à une infection par les guêpes parasitoïdes. Des expériences de double immunolocalisation avec un marqueur de lamellocytes montrent bien que les cellules Col⁺ ne sont pas celles qui se différencient en

lamellocytes. A aucun moment, nous n'avons observé une expression de Col dans les hémocytes différenciés. Les cellules Col⁺ exercent ainsi un rôle instructif en conférant aux prohémocytes présents dans la glande de la lymphe la compétence de se différencier en lamellocytes suite à une infection parasitaire.

Hormis Stat92E, dont nous ne comprenons pas encore clairement le rôle exact dans la différenciation des lamellocytes, Col est le premier transactivateur identifié dans le programme de différenciation de ce lignage hémocytaire.

- Mise en évidence du caractère bipotentiel des prohémocytes

La surexpression de *col* provoque la différenciation massive des prohémocytes en lamellocytes, au détriment de la différenciation des cellules à cristaux qui deviennent rares. En revanche, chez les larves mutantes *col* qui ne peuvent pas différencier les lamellocytes, on observe une augmentation du nombre de cellules à cristaux. La combinaison de ces données suggère que le facteur Col contrôle une balance de différenciation lamellocytes/cellules à cristaux à partir de cellules souches bipotentiels.

- Modèle d'induction des lamellocytes

Nous avons proposé un modèle de différenciation des lamellocytes dans la glande de la lymphe, en réponse à une infection parasitaire. Ce modèle se décompose en deux étapes (Figure 13). Nous proposons que le facteur Col confère la compétence aux cellules du PSC à répondre à un signal informatif (S1), vraisemblablement de type cytokine, émis par les plasmacytes suite à l'infection parasitaire. Dans notre modèle, les cellules du PSC émettent alors un signal secondaire (S2), instructif, vers les prohémocytes pour y déclencher le programme de différenciation des lamellocytes.

IV. Discussion

La dissection du rôle du transactivateur Col dans la spécification du lignage lamellocyte souligne une fois de plus les nombreuses analogies qui existent entre le contrôle du système hématopoïétique chez la drosophile et chez les mammifères. Col chez la drosophile et EBF chez les mammifères, sont tous deux requis pour permettre la différenciation de lignages sanguins médiateurs de l'immunité, respectivement les lamellocytes et les lymphocytes B. Cette analogie est d'autant plus marquante que le développement de ces deux types de cellules présente un caractère d'inductibilité. En effet, ce n'est que lorsqu'ils sont activés par la reconnaissance de motifs

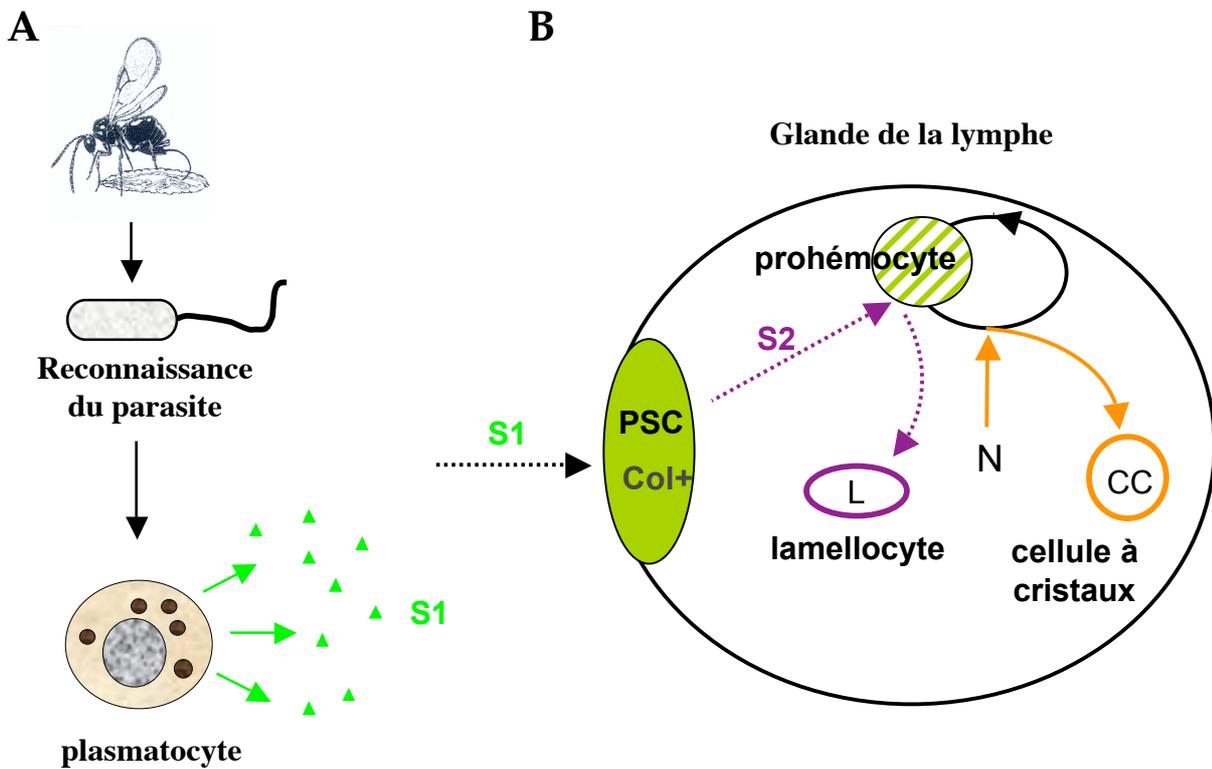


Figure 13: Modèle de différenciation des lamellocytes suite à une infection parasitaire. (A) Lors d’une infection parasitaire par la guêpe *L. bouleari*, l’œuf est reconnu comme infectieux par les plasmatocytes, qui représentent 95% des hémocytes circulants. Nous proposons que les plasmatocytes sécrètent un signal d’alerte (S1) qui diffuse dans l’hémolymphe et signale aux cellules du PSC la nécessité de produire les lamellocytes (L). (B) Les cellules du PSC réagissent en émettant un second signal (S2) vers les prohémocytes pour y déclencher le programme de différenciation des lamellocytes, au détriment de la différenciation des cellules à cristaux (CC). N: Voie Notch

antigéniques infectieux, que les lymphocytes B dont le «*commitment*» a été assuré par EBF, poursuivent leur maturation en se spécialisant en plasmocytes, des cellules dédiées à la production d'anticorps solubles. Chez la drosophile, l'expression de Col dans un groupe de cellules de l'organe hématopoïétique donne aux précurseurs la compétence de se différencier en lamellocytes en réponse à une menace immunitaire particulière. Bien que la drosophile et les mammifères soient très éloignés d'un point de vue évolutif, les deux protéines orthologues EBF et Col sont requises pour le développement de cellules sanguines appropriées, nécessaires pour combattre une infection précise. Ces observations suggèrent l'existence d'une protéine ancestrale Col/EBF, dont l'activité aurait permis à des cellules hématopoïétiques de répondre à un signal immun émis par des cellules circulantes de surveillance immunitaire (de type phagocyte ou macrophage), en achevant leur programme de différenciation.

Ainsi Col et EBF auraient conservé partiellement la fonction de la protéine ancestrale, mais auraient vu diverger leurs modes d'actions. En effet, EBF agit de façon autonome cellulaire il est exprimé directement par les cellules qui sont engagées dans le destin lymphocyte B. Ce n'est pas le cas de Col qui n'agit pas de façon autonome cellulaire et n'est pas exprimé par les précurseurs des lamellocytes, mais par des cellules voisines.

Lebestky et collaborateurs (2003), en analysant le rôle de la voie Notch pour la différenciation des cellules à cristaux, ont identifié le PSC en analysant l'expression de son ligand Ser. En observant que Ser est exprimé par des cellules à localisation très précise dans les lobes primaires de la glande de la lymphé, et qu'il est le seul responsable de l'activation du récepteur Notch dans les prohémyocytes, les auteurs ont défini le PSC comme un centre instructeur pour la différenciation des cellules à cristaux. Néanmoins, ils ont également remarqué quelques cellules Ser⁺ isolées dans les lobes primaires et secondaires. Nous avons démontré que la spécification du PSC dépend de l'activité du facteur Col, et qu'en contexte *col* le PSC est absent. Pourtant, bien que l'expression de Ser soit perdue dans la région du PSC, les cellules à cristaux sont toujours produites dans la glande de la lymphé. Nos résultats sont en désaccord avec ceux de Lebestky et collaborateurs et nous apportons la preuve que le PSC n'est pas indispensable pour la spécification des cellules à cristaux. Notre hypothèse est que les cellules Ser⁺ dispersées dans la glande de la lymphé suffisent à déclencher le programme de différenciation des cellules à cristaux

Le modèle de différenciation des lamellocytes que nous avons proposé concerne les hémocytes des lobes antérieurs de la glande de la lymphé, où nous avons observé que Col est exclusivement exprimé par les cellules du PSC. Ce modèle de différenciation n'inclut pas nécessairement les hémocytes des lobes postérieurs. En effet, les lobes postérieurs ont une

organisation très variable, et beaucoup de cellules dispersées dans les lobes peuvent exprimer Col. Nous ne connaissons pas exactement la nature des cellules Col⁺ des lobes postérieurs, mais une possibilité est que ces cellules correspondent d'un point de vue fonctionnel aux cellules du PSC. Elles pourraient permettre la différenciation des lamellocytes dans les lobes postérieurs. Cette hypothèse est étayée par l'observation que Ser, un marqueur spécifique des cellules du PSC, est également exprimé par des hémocytes dispersés dans les lobes postérieurs (Lebestky et al., 2003). Il serait intéressant de savoir si les deux expressions Col et Ser colocalisent, et si ces cellules expriment également les autres marqueurs génétiques des cellules du PSC.

Dans notre modèle, nous proposons qu'un signal d'alerte émis par les plasmatocytes est intégré par les cellules du PSC, lesquelles assurent l'activation du programme de différenciation des lamellocytes dans les prohémyocytes voisins. Le mécanisme d'activation que nous privilégions aujourd'hui est la synthèse par les cellules du PSC d'une molécule signal (S2), de type cytokine, qui diffuse dans la glande pour atteindre les prohémyocytes. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité que cette activation puisse se faire par des contacts cellulaires entre les cellules du PSC et les prohémyocytes. L'observation récente que les cellules du PSC forment de longues extensions cytoplasmiques de type filopodes (M. Crozatier, communication personnelle), suggère cette éventualité. De plus, des cellules Col⁺ semblant provenir du PSC sont parfois observées dans d'autres zones des lobes primaires, et pourraient informer les prohémyocytes plus éloignés. Néanmoins, ces cellules Col⁺ sont rares. Nous pouvons aussi proposer que les filopodes sont impliqués dans les processus de spécification des cellules à cristaux. Ceci serait en accord avec le rôle du couple ligand-récepteur Ser-Notch dans la différenciation de ces cellules.

Pour son rôle dans la spécification des muscles embryonnaires, *col* est exprimé dans chaque hémisegment par la cellule précurseur des muscles DA3 et DA5. L'expression de *col* est ensuite restreinte dans les muscles DA3, où il contrôle leur développement, mais la spécification des muscles DA5 nécessite la répression de *col* par Notch (Crozatier and Vincent, 1999). De façon intéressante, ces deux partenaires Col et Notch sont impliqués dans les choix de lignages de différentes cellules musculaires et hémocytaires. En effet, nous savons que la voie Notch est impliquée dans la différenciation des cellules à cristaux, et qu'elle est également nécessaire à la différenciation des lamellocytes, puisque des larves *Notch* thermosensibles, élevées à température restrictive, produisent beaucoup moins de lamellocytes suite à une infection parasitaire (Duvic et al., 2002). Compte tenu de ces informations, une interaction entre la voie Notch et *col* dans le développement du système hématopoïétique peut être envisagée, d'autant plus que la surexpression d'une forme active du récepteur Notch dans les cellules du PSC semble altérer l'expression de *col* (M. Crozatier, communication personnelle). Cette dualité entre Col et Notch

pourrait être un facteur important de la balance de différenciation des précurseurs hémocytaires de la glande de la lymphé. Des études supplémentaires sont nécessaires pour définir la nature réelle de cette interaction.

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle de la voie JAK/STAT dans le processus de différenciation des lamellocytes en réponse aux infections parasitaires. Les mutations perte-de-fonctions qui affectent les composants de la voie JAK/STAT sont associées à un défaut de différenciation des lamellocytes (Sorrentino et al., 2004). En revanche, la mutation gain-de-fonction *hop^{Tum-1}* conduit à une différenciation massive des lamellocytes (Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995). Par épistasie, nous avons montré que les mutations nulles *col* n'abolissent pas le phénotype associé à la mutation gain de fonction *hop^{Tum-1}* (non publié), ce qui nous suggère que la voie JAK/STAT fonctionne en aval de Col. Deux possibilités sont alors envisageables. La voie JAK/STAT pourrait fonctionner dans les cellules du PSC pour transmettre le signal S1 et induire l'expression du signal S2. Cette possibilité suppose que la voie JAK/STAT soit sous la dépendance du récepteur R1. La deuxième possibilité est que la voie JAK/STAT agisse dans les prohémoctes sous le contrôle du récepteur R2. Dans ce dernier cas, la voie JAK/STAT contrôlerait l'expression des gènes de spécification des lamellocytes.

Enfin, je conclurai cette discussion sur l'ambiguïté de la fonction de Col dans les cellules du PSC. Nous ne comprenons pas encore à quel niveau le facteur Col agit. Est-il nécessaire pour induire l'expression d'un récepteur de surface qui puisse reconnaître les signaux (S1) provenant de l'extérieur? Si oui, la surexpression du facteur Col ne devrait pas forcer la différenciation des lamellocytes, à moins que cette surexpression ne finisse par provoquer une transcription accrue du récepteur en question. A son tour, la grande quantité de récepteurs à la surface des cellules pourrait entraîner leur dimérisation et leur autoactivation, et ainsi l'activation des voies fonctionnant en aval.

Une autre éventualité serait que Col soit impliqué dans la régulation de l'expression du gène codant le signal S2. Cependant, S2 devrait alors être exprimé de façon permanente puisque Col est présent dans les cellules du PSC en conditions non infectieuses et cette expression ne subit aucune modification suite à une infection parasitaire. De fait, nous avons pu remarquer à plusieurs reprises par immunolocalisations que Col présente une localisation cytoplasmique dans de nombreuses cellules du PSC et nucléaire dans d'autres (données personnelles, non publiées). Cette observation suggère la possibilité que Col soit séquestré dans le cytoplasme pour être transporté dans le noyau lors d'une infection parasitaire. Avec cette hypothèse, la surexpression de Col

devrait suffire à forcer la différenciation des lamellocytes, mais aucune régulation de ce type n'a, jusqu'à présent, été rapportée pour Col dans la bibliographie.

V. Objectifs à la recherche des partenaires de Col

Après le décryptage du rôle de Col dans l'hématopoïèse de la drosophile, la suite de mon travail avait pour but d'apporter de nouvelles informations moléculaires sur les contrôles génétiques qui régulent la spécification des lamellocytes. L'objectif de ce projet était d'identifier de nouveaux gènes qui s'intègrent dans le modèle de réponse antiparasitaire que nous avons proposé.

L'approche expérimentale à laquelle j'ai participé a consisté en l'étude des transcrits de la glande de la lymphe par puces à ADN Affymetrix. Les mutants *col* sont incapables de monter une réponse antiparasitaire, ce qui suppose que ce facteur contrôle l'expression de gènes qui sont importants pour l'intégration et la transmission des signaux d'alerte. Bien que nous ne connaissions pas le mécanisme d'action exact du facteur Col dans l'hématopoïèse de la drosophile, sa surexpression entraîne la différenciation des lamellocytes, et donc l'activation des gènes qui permettent la détermination de ce lignage. Pour rechercher les gènes cibles du facteur Col, nous avons comparé l'activité transcriptionnelle d'organes hématopoïétiques dans lesquels nous avons forcé la différenciation des lamellocytes par surexpression de Col, à celle de glandes de la lymphe contrôles.

En analysant les données des puces, nous avons trouvé de nombreux gènes dont l'expression est altérée par la surexpression de Col. A titre d'exemple, 122 gènes présentent une augmentation du niveau d'expression d'au minimum deux fois. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée, notre attention s'est particulièrement portée sur les gènes codant des protéines transmembranaires qui pourraient jouer le rôle de récepteur pour les signaux S1 ou S2.

Un gène particulièrement intéressant a attiré notre attention. Il est annoté *CG14225* dans les bases de données. Ce gène, jusque là non caractérisé, code un récepteur homologue des récepteurs de cytokines de type gp130 des mammifères. Dans le troisième chapitre des résultats, je présenterai les caractéristiques des récepteurs gp130 ainsi que leurs fonctions dans le système hématopoïétique des mammifères. Je décrirai ensuite les données préliminaires qui nous suggèrent que *CG14225* est un bon candidat pour coder le récepteur R2 de notre modèle. Les approches par transgénèse que nous avons adoptées ne nous ont pas permis jusqu'ici de démontrer une fonction

de ce gène dans l'hématopoïèse de la drosophile. Je présenterai les stratégies que j'ai développées pour générer des mutants nuls, qui seuls nous permettront de conclure sur son implication.

CHAPITRE III

Les homologues des récepteurs IL-6R des mammifères dans l'hématopoïèse de la drosophile

Les homologues des récepteurs IL-6R des mammifères dans l'hématopoïèse de la drosophile

I. Introduction

Nous avons identifié à partir des puces à ADN le gène *CG14225*. Dans les glandes de la lymphe surexprimant le facteur Col, ce gène est 1.8 fois plus fortement transcrit que dans les glandes contrôles sauvages. Ce gène code une protéine transmembranaire présentant de nombreuses caractéristiques des récepteurs de type IL6-R/gp130 des mammifères. Cette caractéristique fait de lui un candidat intéressant puisque cette famille de récepteurs signale par la voie JAK/STAT, et nous avons montré au laboratoire, par épistasie, que la voie JAK/STAT fonctionne en aval de Col dans le programme de différenciation des lamellocytes.

A. Les récepteurs à cytokines de la famille IL-6R des mammifères

L'Interleukine-6 (IL-6), l'IL-11, l'oncostatine M (OsM), le «Leukemia inhibitory factor» (LIF), et le «Ciliary neurotrophic factor» (CNTF) sont des cytokines appartenant à la famille des cytokines dites de type IL-6 (Ernst and Jenkins, 2004; Heinrich et al., 2003). Ces cytokines présentent des redondances fonctionnelles dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la maturation de cellules appartenant à plusieurs lignées hématopoïétiques. L'importance des cytokines de la famille IL-6 dans la régulation de l'hématopoïèse a été démontrée avec des souris portant des modifications génétiques dans les gènes codant ces interleukines ou leurs récepteurs. Par exemple, les souris KO pour IL6 ou LIF présentent une diminution sévère du nombre de cellules souches hématopoïétiques (Ernst and Jenkins, 2004).

Les récepteurs des cytokines de la famille des IL-6 (IL-6R) sont caractérisés par la présence, dans leur région extracellulaire d'une série de domaines Fibronectine-type-III (FNIII) et d'un domaine «Immunoglobulin-like» (Figure 14). Chaque récepteur contient au minimum un «Cytokine Binding Module» (CBM) composé de deux domaines FNIII, lesquels renferment quatre résidus cystéines clefs dans la région N-terminale, ainsi qu'un motif WSXWS en C-terminal. Ce CBM est indispensable pour l'interaction avec le ligand.

Les récepteurs de la famille des IL-6R sont composés de deux types de sous-unités, α et β . De façon générale, les cytokines IL-6 se lient à des récepteurs α qui leur sont spécifiques, et qui

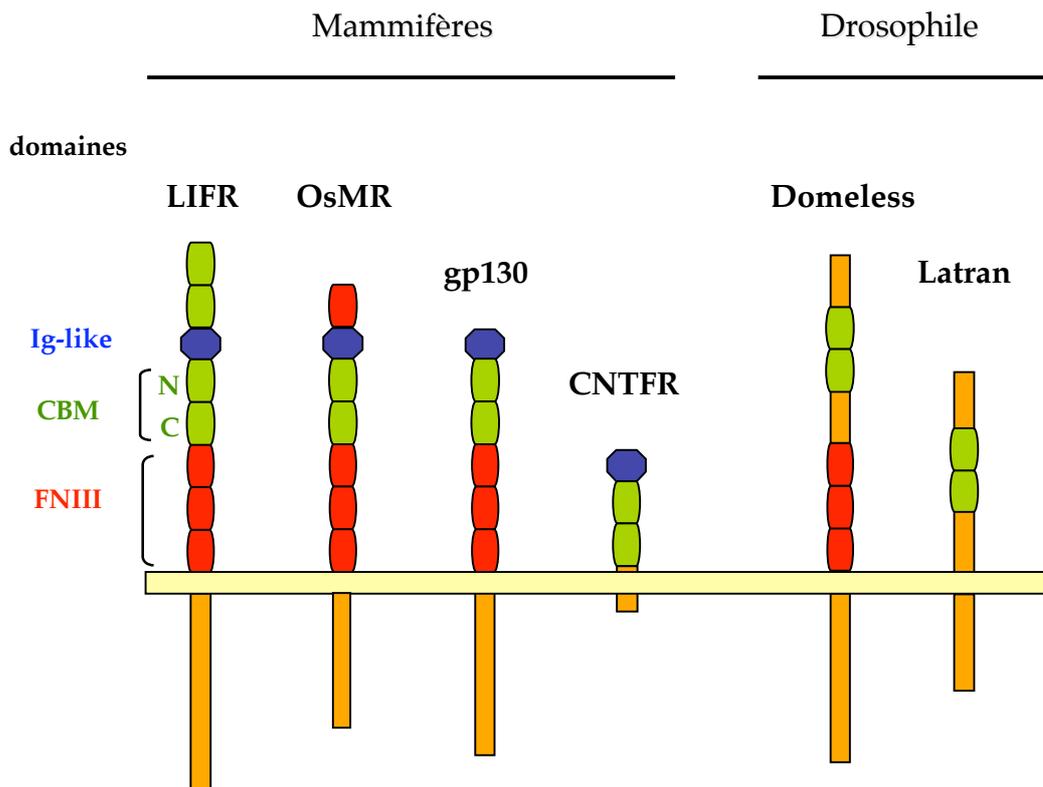


Figure 14 : Les récepteurs de la famille IL-6R des mammifères et leurs homologues chez la drosophile. Les domaines Fibronectin III (FNIII) sont représentés en rouge. Les modules de fixation aux cytokines (représentés en vert) sont composés de deux domaines de type FNIII: un domaine N-terminal (CBM N) renfermant quatre cystéines conservées, et un domaine C-terminal (CBM C) avec un motif WSXWS essentiel pour la signalisation. Les récepteurs IL-6R des mammifères possèdent un motif «Immunoglobulin-like». CNTFR est un récepteur \square , alors que LIFR, gp130 et OsMR sont des récepteurs \square . Deux récepteurs homologues des IL-6R existent chez la drosophile. Les comparaisons de séquence révèlent que Domeless est plus le plus proche de CNTFR alors que Latran est un homologue de gp130.

sont exprimés de façon restreinte. Les récepteurs □ n'ont pas de capacité de signalisation intrinsèque, et la transmission du signal nécessite le recrutement et la dimérisation de récepteurs □ (Figure 15). La redondance fonctionnelle des cytokines de la famille IL-6 résulte de l'utilisation commune d'une sous-unité □ réceptrice, appelée gp130 et qui, elle, est exprimée de façon ubiquitaire. Les autres sous-unités □ sont spécifiques à une ou plusieurs cytokines et sont exprimées de façon restreinte.

Deux cas de figures sont possibles en fonction des couples ligand-récepteur. La fixation de IL-6 et IL-11 sur leur récepteur □ spécifique, respectivement IL-6R□ et IL-11R□, induit l'homodimérisation du récepteur □ gp130 pour permettre la signalisation intracellulaire (Figure 15A). Les autres membres de cette famille de cytokine, après fixation sur leur sous-unité □ spécifique, provoquent la dimérisation de gp130 avec une autre sous-unité □, LIFR□ ou OsMR□, fonctionnellement et structuralement similaires à gp130 (Figure 15B).

Les récepteurs □ sont associés, dans leur région cytoplasmique, à des kinases de la famille JAK. Le mode d'activation privilégié est que la dimérisation des récepteurs □ rapproche leurs kinases JAK qui vont alors se phosphoryler. Cependant, certains dimères de récepteurs □ ont pu être observés, par cristallographie et par co-immunoprécipitation, en absence de leur ligand, ce qui suggère un mode d'action alternatif. Dans ce modèle la dimérisation des récepteurs □ est indépendante du ligand et précède sa fixation. Les kinases JAK seraient activées par un changement de la conformation des récepteurs suite à la fixation du ligand. Un tel mode d'action a été démontré pour le récepteur à l'insuline, dont la structure présente de nombreuses homologies avec le récepteur gp130 (Grotzinger, 2002).

Une fois les kinases activées, elles phosphorylent les récepteurs □ au niveau de résidus tyrosines clef de la région cytoplasmique. Les tyrosines phosphorylées dans la région distale représentent des sites de fixation pour les facteurs STAT. Tous les récepteurs de la famille des IL-6R induisent l'activation des facteurs STAT3, et avec une affinité plus faible STAT1. Les STAT sont activés par une phosphorylation qui est JAK dépendante, et qui induit leur dimérisation ainsi que leur transport dans le noyau où ils régulent l'expression de gènes cibles.

La phosphorylation d'une tyrosine en position proximale facilite la fixation des régulateurs négatifs de type SOCS, et réagit également avec la phosphatase SHP2 qui, une fois phosphorylée, active les voies MAPK et PI3K. Ces voies sont impliquées dans la protection des cellules contre l'apoptose (Heinrich et al., 2003).

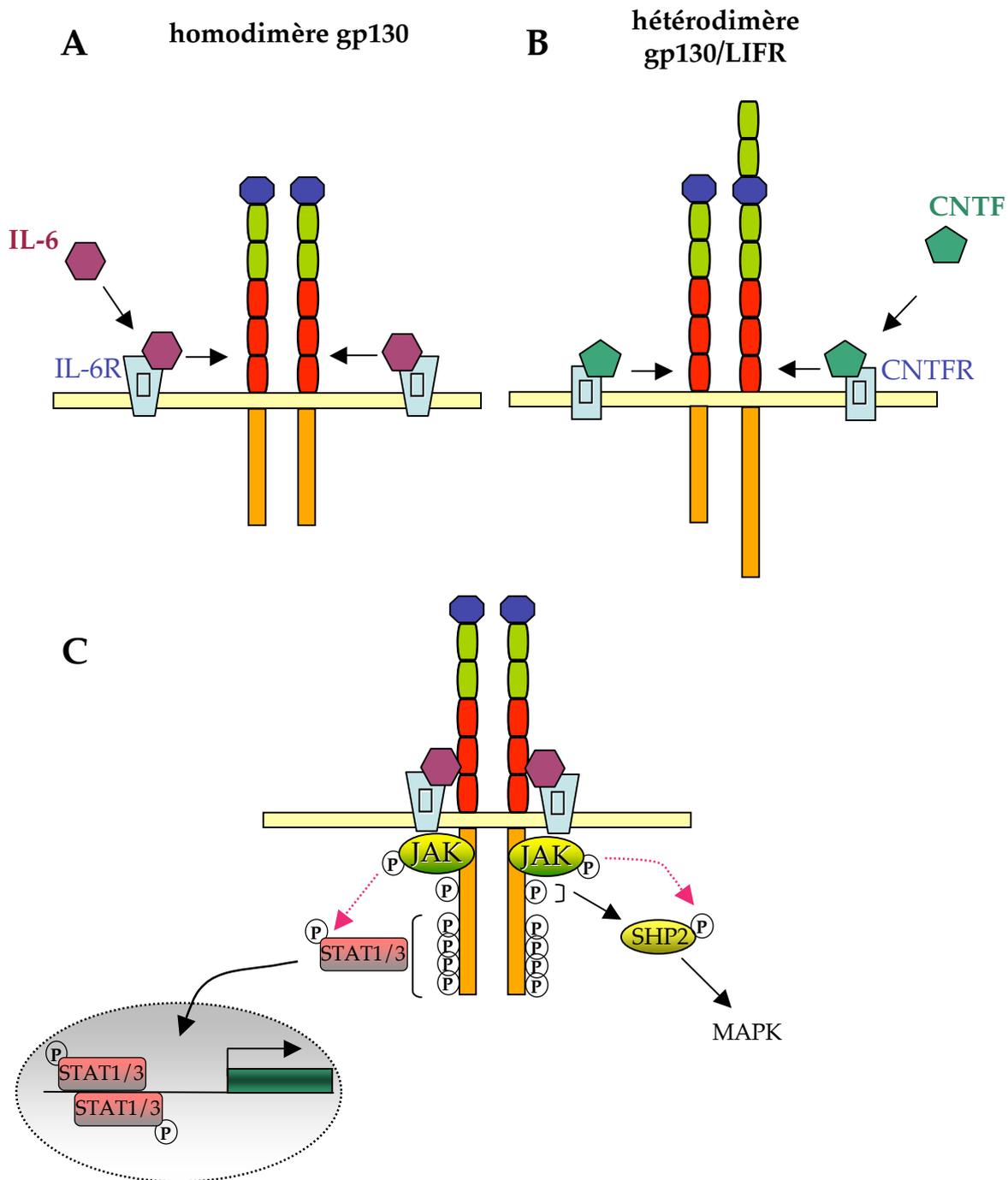


Figure 15 : La signalisation par les récepteurs de la famille IL-6R chez les mammifères. La fixation du ligand à son récepteur \square active la dimérisation des sous-unités \square pour transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. Les cytokines IL-6 et IL-11 induisent la formation d'un homodimère gp130 (A), alors que les autres cytokines de la famille des IL-6 (OsM, LIF, CNTF) provoquent la dimérisation du récepteur gp130 avec la sous unité \square LIFR (B) ou OsMR (non représentée). La fixation du ligand et la dimérisation des sous-unités \square entraînent la phosphorylation de résidus tyrosines clés par les kinases JAK associées aux récepteurs. Ces phosphorylations sont indispensables pour activer deux cascades de signalisations intracellulaires, SHP2/MAPK et STAT1/3.

Le récepteur gp130, en contrôlant l'activation des facteurs STAT1 et 3, est un récepteur important pour la régulation de nombreux processus hématopoïétiques. Les souris déficientes pour la sous-unité gp130 présentent un blocage de l'hématopoïèse fœtale accompagné d'une réduction importante du nombre de progéniteurs hématopoïétiques. Une activation persistante de STAT3 est fréquemment observée dans des désordres hématologiques de type myéloprolifératifs et lymphoprolifératifs (Benekli et al., 2003; Ernst and Jenkins, 2004).

B. Les homologues des récepteurs IL-6R/gp130 chez la drosophile

Un seul récepteur de la voie JAK/STAT est fonctionnellement identifié chez la drosophile, ce récepteur, appelé Domeless (Dome, également connu sous le nom de MOM pour Master Of Marelle), présente de nombreuses caractéristiques des récepteurs IL-6R évoqués plus haut (Brown et al., 2001; Brown et al., 2003; Chen et al., 2002) (Figure 14). Sa séquence protéique s'apparente d'avantage à CNTFR et LIFR. L'activation de la voie JAK/STAT dans l'ectoderme des embryons de drosophile nécessite l'homodimérisation de Dome (Brown et al., 2003). Cependant, des données expérimentales suggèrent que cette dimérisation est indépendante de son ligand Upd. Ainsi, la formation des homodimères Dome dans l'ectoderme est une première étape pour permettre la fixation du ligand Upd et l'activation de JAK/STAT. Cette étude suggère également la possibilité que Dome puisse former un hétérodimère avec un deuxième récepteur encore inconnu. En effet, dans certains tissus où la voie JAK/STAT est active, l'homodimérisation de Dome n'a pas pu être mise en évidence, alors que Dome est indispensable à l'activation de la voie JAK/STAT pour toutes ses fonctions embryonnaires (Ghiglione et al., 2002)

Aucun récepteur supplémentaire pour la voie JAK/STAT n'a été fonctionnellement identifié chez la drosophile. Cependant, suite au séquençage de son génome, un autre gène codant une protéine très proche des récepteurs IL-6R des mammifères a pu être identifié (Hombria and Brown, 2002). Ce gène, annoté *CG14225*, est adjacent à *dome* et sa séquence protéique montre une grande homologie avec le récepteur gp130 (Figure 14).

Les domaines intracellulaires de Dome et *CG14225* ne présentent aucune homologie avec les motifs recensés dans les bases de données. Néanmoins, la région intracellulaire de Dome est indispensable pour sa fonction de signalisation, et des études épistatiques ont démontré que *dome* interagit avec *Stat92e* (Chen et al., 2002)

En résumé, les données dont nous disposons sont que les gènes *dome* et *CG14225* sont les seuls dans le génome de la drosophile qui codent des homologues des récepteurs IL-6R. Les

récepteurs IL-6R fonctionnent en étroite collaboration avec la voie JAK/STAT chez les mammifères et le rôle de Dome en tant que récepteur de la voie JAK/STAT a été démontré chez l'embryon. Nous savons également que la voie JAK/STAT est impliquée dans le programme de différenciation des lamellocytes et que le gène *CG14225* est plus fortement transcrit dans les hémocytes lorsque nous y surexprimons le facteur Col. Ce contexte génétique, nous l'avons vu dans le chapitre II, conduit à l'activation du programme de différenciation des lamellocytes. Compte tenu de ces observations, nous avons considéré que ces deux gènes représentaient de bons candidats pour être impliqués dans la différenciation des lamellocytes.

Dans notre équipe et à usage interne, nous avons appelé *latran* le gène *CG14225*. Je ferai donc référence au gène *latran* et à la protéine Latran dans la suite de mon rapport.

II. Données préliminaires

A. Latran et Domeless, deux candidats pour le récepteur R2

La première expérience que nous avons réalisée fut de valider les données des puces à ADN en vérifiant, par hybridation *in-situ*, que *latran* était bien exprimé par les hémocytes de la glande de la lymphe (Figure 16A,B). Nous avons ainsi observé que *latran* n'y est pas transcrit de façon ubiquitaire. Son expression est détectée dans les cellules de la zone médullaire des lobes antérieurs, et dans les cellules des lobes postérieurs. D'après les analyses morphologiques et immunohistochimiques effectuées par Jung (2005, voir introduction), ce profil d'expression reflète essentiellement la distribution des précurseurs hémocytaires dans la glande de la lymphe. *latran* est donc vraisemblablement exprimé dans les prohémocytes. En revanche, contrairement à *dome* qui est largement exprimé au stade embryonnaire, aucune expression zygotique ou maternelle de *latran* n'a été détectée par hybridation *in-situ* chez l'embryon. De même, les hybridations *in-situ* effectuées sur des larves entières disséquées n'a révélé aucune expression de *latran* dans un tissu particulier. Ces observations suggèrent que Latran présente un profil d'expression très restreint, alors que Dome est plus largement exprimé.

Bien que les transcrits *dome* ne soient que très faiblement détectés sur les puces à ADN, et que son expression ne soit pas modifiée par surexpression de *col* dans la glande de la lymphe, une étude récente suggère que *dome* est exprimé dans les prohémocytes (Jung et al., 2005). En effet, la pilote *dome-gal4*, où la région promotrice de *dome* contrôle l'expression du transactivateur Gal4,

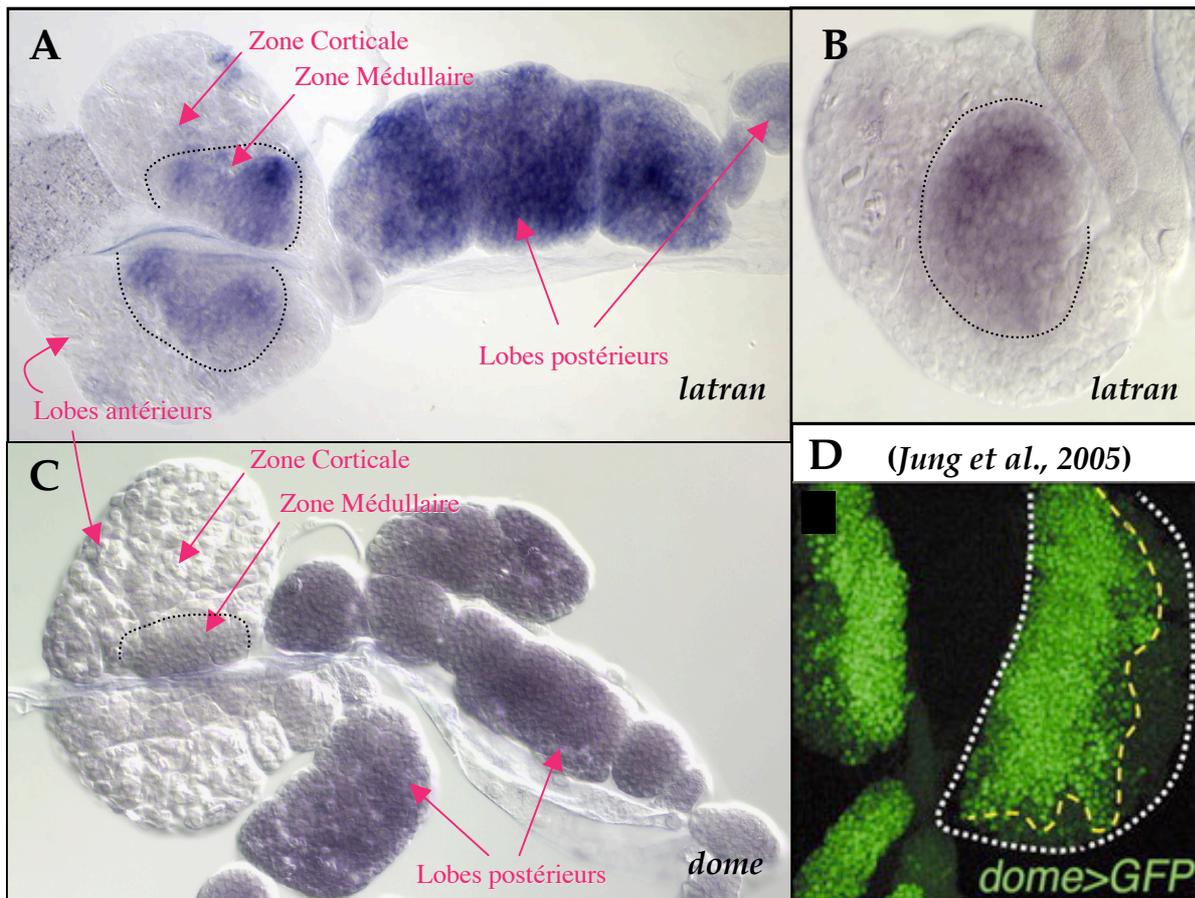


Figure 16: Expression de *latran* et *domeless* dans la glande de la lymphe. Par des hybridations *in situ* sur des glandes de la lymphe (A,C), nous observons que *latran* et *domeless* sont exprimés dans un grand nombre d'hémocytes des lobes postérieurs. Tous deux sont également exprimés dans la zone médullaire des lobes antérieurs (B,D). Le pilote *dome-gal4*, qui permet l'expression d'un gène rapporteur dans le domaine d'expression de *dome*, conduit l'expression de la GFP dans la zone médullaire (D, Jung et al., 2005).

conduit préférentiellement l'expression de gènes rapporteurs dans les hémocytes de la zone médullaire (Figure 16C,D). En effet, par hybridation *in-situ*, nous avons pu constater que Dome est exprimé dans les hémocytes de la zone médullaire, ainsi que dans les hémocytes des lobes postérieurs. Si nous nous basons sur les caractéristiques structurales des protéines Latran et Dome, et sur leur domaine d'expression spécifique dans la glande de la lymphé, elles pourraient toutes deux correspondre au récepteur R2 de notre modèle. Sachant que les récepteurs de la voie JAK/STAT chez les vertébrés agissent en tant qu'homodimères ou hétérodimères, nous avons considéré trois possibilités i) Latran agit sous la forme d'un homodimère comme récepteur de la voie JAK/STAT pour la différenciation des lamellocytes ii) Dome agit seul dans ce processus, ou encore iii) Latran et Dome agissent ensemble sous la forme d'un hétérodimère.

B. Les approches transgéniques

De nombreuses lignées de drosophiles mutantes pour *dome* sont disponibles dans les «Stocks Center». Cependant, toutes les perte-de-fonctions *dome* provoquent une létalité embryonnaire causée par de nombreux défauts développementaux. Les embryons perte-de-fonctions meurent avant l'éclosion, ce qui nous empêche d'étudier directement les effets de la mutation *dome* sur l'hématopoïèse larvaire de la drosophile.

En ce qui concerne *latran*, aucune lignée mutante n'est disponible à l'heure actuelle, que ce soit dans les «Stock Center», ou dans les diverses banques d'éléments P (élément transposable, qui en s'insérant dans le gène d'intérêt génère des allèles nuls ou tronqués). Nous avons, dans un premier temps, adopté une stratégie de transgènes pour tenter d'élucider le rôle potentiel des récepteurs Latran et Dome dans les processus hématopoïétiques de la drosophile.

- Technique de «silencing» par RNA interférant

Des lignées transgéniques UAS-*latran*^{RNAi} ont été générées dans l'équipe. La technique du RNAi permet d'engendrer des mutants hypomorphes en détruisant de façon spécifique les transcrits des gènes ciblés. Bien que la diminution du niveau de transcrit ait été significative, aucun effet de la diminution d'activité de *latran* n'a été observé sur la spécification des lignages hémocytaires au stade larvaire. Les larves *srp>latran*^{RNAi} infestées par les guêpes endoparasites gardent leurs capacités à produire de nombreux lamellocytes et à former des capsules mélaniques. Les autres types hémocytaires, plasmatocytes et cellules à cristaux, ne semblent pas davantage être affectés.

- Les formes Dominante-Négatives

Deux lignées transgéniques permettant la surexpression de deux formes dominante-négatives (DN) du récepteur ont également été construites. Les constructions DN correspondent à la protéine Latran tronquée de son domaine transmembranaire et/ou cytoplasmique. Nous avons également récupéré des lignées transgéniques portant des constructions DN similaires de Dome (don de J. Castelli-Gair Hombria). La surexpression de ces formes DN dans la glande de la lymphe avait pour but de bloquer la signalisation des récepteurs correspondants en titrant leur ligand ou en inhibant leur dimérisation. Les larves surexprimant les formes DN de Latran ou de Dome ont été testées pour la production des lamellocytes après infection par *L. bouvardi* □ aucun effet n'a été observé. Les larves avaient un phénotype sauvage.

- La surexpression des formes natives

Des lignées transgéniques UAS-*latran* permettant la surexpression de la forme native du récepteur ont été établies. Nous avons de même récupéré des lignées UAS-*dome* (don de J. Castelli-Gair Hombria). Nous avons testé la surexpression de chaque récepteur et son effet sur le développement des hémocytes. La surexpression de Latran dans les hémocytes de la glande de la lymphe n'entraîne aucune modification dans les populations hémocytaires. En revanche, la surexpression de Dome provoque la différenciation de lamellocytes. La double surexpression provoque un phénotype intermédiaire.

- Conclusions

Les résultats que nous avons obtenus par la surexpression des formes natives des récepteurs sont en accord avec la possibilité que Dome est impliqué dans la différenciation des lamellocytes. D'autre part, bien qu'ils soient tous négatifs, les résultats que nous avons obtenus avec les différentes constructions *latran* (RNAi, DN et natif) ne nous permettent pas de conclure sur le rôle de Latran dans la différenciation des lamellocytes. En effet, des critiques peuvent être apportées pour chacune des approches transgéniques décrites ci-dessus. Ces critiques, dont je parlerai dans la discussion du chapitre III, mettent en évidence les limites des approches par surexpression pour l'analyse fonctionnelle d'un gène. Il est toujours indispensable d'avoir recours à un mutant nul. Dans le but d'analyser de façon incontestable l'implication de Latran dans la différenciation des lamellocytes, j'ai développé deux approches différentes pour invalider le gène *latran* et générer des lignées mutantes perte-de-fonction.

III. Génération d'un mutant *latran* perte-de-fonction

A. Mutagenèse par mobilisation d'éléments P

1. Principe

Lorsque l'on ne dispose pas de lignées mutantes pour un gène d'intérêt, la drosophile offre, outre les procédés de mutagenèse classiques (agents chimiques tel que l'Ethyl-Méthane-Sulfonate), la possibilité d'utiliser des transposons (par exemple l'élément P) comme source mutagène. Le but est d'insérer un élément P dans la région promotrice du gène, ou alors directement dans le gène, de façon à perturber son expression et générer des mutants nuls ou hypomorphes.

Chez la drosophile, il est possible de manipuler la transposition d'un élément P. Le procédé repose sur l'utilisation d'une lignée de drosophile portant un élément P défectif. Un élément P défectif est immobile car il ne contient plus le gène de la transposase, l'enzyme qui catalyse les événements de transposition. La mobilisation de cet élément P défectif est obtenue en croisant la lignée de départ avec une lignée portant un autre transposon qui apporte la transposase. Ce dernier transposon ne peut pas lui-même être transposé car ses extrémités ont été modifiées pour que la transposase ne puisse l'exciser. Pour arrêter le processus de transposition, il suffit de retirer la source de transposase à la génération suivante.

Une fois qu'un élément P s'est inséré dans le gène cible ou à proximité, on peut dans un deuxième temps provoquer des excisions imprécises du transposon, et sélectionner par la suite les événements qui ont généré des déficiences qui délètent le gène d'intérêt.

L'intérêt d'une mutagenèse à l'élément P est qu'elle ne nécessite pas d'hypothèse, à priori, sur le phénotype attendu des mutants. On peut en effet utiliser un crible uniquement moléculaire, qui détecte l'insertion d'un élément P dans la région génomique. Ce crible est basé sur une stratégie de PCR.

Lors d'une transposition, l'élément mobile a une forte tendance à s'intégrer localement, à proximité de son site d'origine (Tower et al., 1993). Ainsi, pour obtenir une insertion dans la région du gène *latran*, il est judicieux de partir d'une lignée transgénique portant un élément P le plus proche possible. J'ai donc, dans un premier temps, recherché les bons outils pour cette mutagenèse.

2. Recherche d'éléments P proches de *latran*

J'ai interrogé les banques de données de drosophile (BDGP, Flybase), pour trouver les éléments P dans la région du gène *latran*. Ce gène, situé sur le chromosome X, est bordé en amont par *dome*, et en aval par le gène *Zwischenferment* (*Zw*) (Figure 17A). Le gène *Zw* a une orientation inverse de *latran* et code une Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase. Plusieurs éléments P sont insérés dans la région promotrice de *dome*, ainsi que dans sa région 5'UTR. D'autres éléments P sont insérés dans la séquence du gène *Zw*.

Ces deux groupes de transposons sont ainsi situés à proximité de *latran*, à environ 8 kb de son site d'initiation de la transcription. Cette proximité rendait envisageable une approche de mutagenèse par sauts locaux.

3. Mobilisation de l'élément P par sauts locaux

Afin de générer de nouveaux sites d'insertion à partir des lignées P{lacW}dome[G0PX] (X correspond au numéro de la lignée mutante) et P{lacW}Zw[GE23], j'ai effectué les croisements suivants

G0 300 drosophiles femelles vierges portant l'élément P sont croisées avec 100 mâles apportant le gène de la transposase. Ces femelles proviennent des lignées pour lesquelles j'ai pu observer, dans un test préalable, les meilleures efficacités de mobilisation. La transposition est effective dans la lignée somatique et germinale et les drosophiles dysgéniques sont identifiables par leurs yeux mosaïques.

G1 Les évènements de recombinaison dans les cellules de la lignée somatique sont visibles à cette étape. Les femelles vierges avec les yeux mosaïques sont croisées avec des mâles portant le chromosome balancier *FM6w*.

G2 Les évènements de recombinaison dans la lignée germinale peuvent être identifiés grâce à la pigmentation de l'œil des descendants. Le rapporteur *mini-white* en contexte *w⁻* confère aux yeux une coloration pouvant aller du jaune pâle au rouge vif en fonction du site d'insertion de l'élément P. Afin d'établir les lignées mutantes, les femelles vierges chez lesquelles la mobilisation est effective sont croisées avec des mâles balanciers *FM6w*.

De cette manière, j'ai pu générer 1800 lignées mutantes, que j'ai ensuite criblées pour rechercher une insertion dans le gène *latran*. J'ai pour cela utilisé une stratégie de PCR. Pour chaque lignée, l'ADN génomique a été préparé à partir d'une seule mouche.

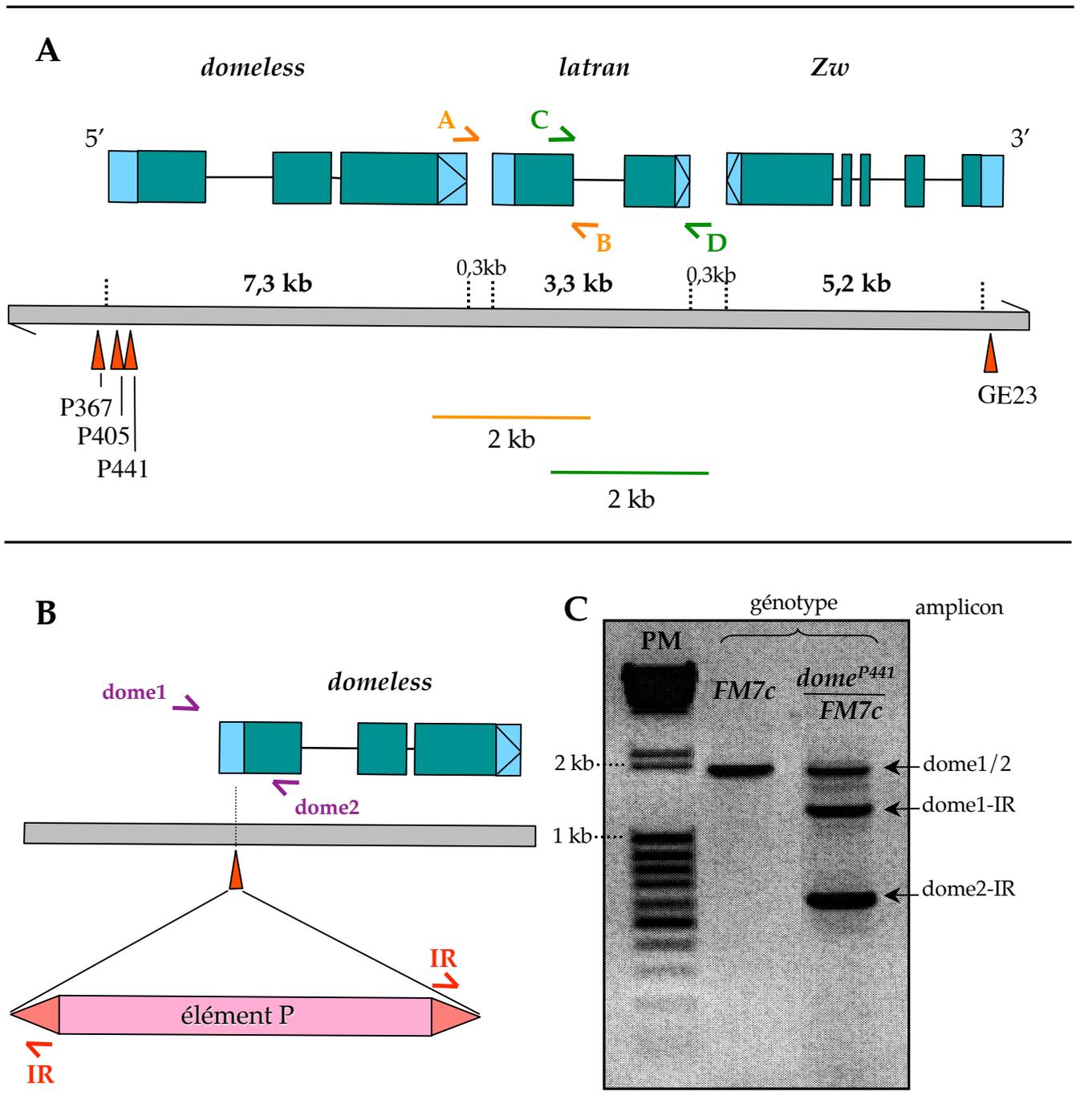


Figure 17: Les éléments P au voisinage de *latran* et la stratégie de PCR pour le criblage des lignées mutantes. (A) Organisation des gènes *latran* et *domeless* sur le chromosome X. De nombreux sites d'insertion d'éléments P sont localisés dans la région promotrice de *domeless*, ainsi que sa région 5'UTR. Un élément P est localisé dans le gène *Zw*. Après mobilisation des éléments P, les lignées sont testées par PCR, en utilisant deux couples d'amorces oligonucléotidiques (A-B et C-D) en combinaison avec une amorce spécifique pour l'élément P (IR). (B) La détection des éléments P par PCR a été testée avec les lignées de départ P{lacW}*dome* en utilisant des amorces (dome1/2) qui entourent les sites d'insertions et l'amorce IR. (C) Si un élément P est inséré sur le chromosome entre deux amorces, deux fragments supplémentaires sont amplifiés par PCR, qui résultent de la combinaison de l'oligonucléotide IR avec les deux amorces dome1/2. PM: marqueur de taille.

J'ai utilisé deux couples d'amorces (A-B et C-D) permettant d'amplifier des fragments PCR (amplicons) d'environ 2 kb chacun de façon à recouvrir les 3.3 kb du locus *latran* (Figure 17A). Ces amplifications constituent les témoins positifs de chaque réaction de PCR. En effet, l'ADN qui sert de matrice aux réactions PCR provient de mouches qui portent à la fois le chromosome mutagénéisé et le chromosome balancier. Le chromosome balancier sert de matrice pour l'amplification des fragments témoins. En plus du couple d'amorces spécifiques, j'ai introduit un oligonucléotide (IR) complémentaire des séquences inversement répétées qui flanquent l'élément P, et orienté vers l'extérieur de l'élément. On obtiendra une amplification additionnelle (en plus du fragment témoin) seulement si l'élément P s'intègre à proximité de la séquence correspondant à l'une des amorces A, B, C ou D (Figure 17B,C).

Avant de commencer le crible PCR, j'ai testé la faisabilité d'une telle approche et l'efficacité d'amplification d'une réaction PCR avec un mélange de trois amorces. J'ai utilisé pour cela les lignées où les éléments P sont insérés dans la région promotrice de *dome*. Pour ces PCR contrôles, j'ai dessiné un couple d'amorces spécifiques (*dome1-dome2*) que j'ai utilisé en combinaison avec l'oligonucléotide IR. Ce test m'a également permis de contrôler la présence des éléments P dans les lignées de départ.

Afin de minimiser les manipulations et le coût de l'expérience, j'ai testé dans chaque réaction de PCR, non pas une lignée, mais un mélange de 5 lignées présentant des événements d'insertion indépendants. Une mise au point préalable m'avait permis de déterminer que dans ces conditions j'étais toujours capable de détecter un événement intéressant dans l'une des cinq lignées.

4. Résultats

J'ai utilisé pour la mutagenèse les lignées P{lacW}*dome*[G0PX], c'est-à-dire celles qui présentent des éléments P insérés en 5' de *dome*. Dans un premier temps, j'ai vérifié que les éléments P de départ avaient été correctement excisés dans les lignées établies. Pour cela, j'ai contrôlé l'absence d'élément P aux abords de *dome* dans 10% des lignées que j'ai générées et choisies au hasard. Par PCR, avec la combinaison d'amorces *dome1-dome2* et IR, je n'ai observé aucune amplification due à la présence dans le milieu réactionnel de l'amorce IR. Ceci démontrait l'efficacité de la mobilisation.

J'ai analysé chacune des 1800 lignées établies par la stratégie de PCR décrite plus haut. Malheureusement, dans aucune de ces lignées, je n'ai pu identifier d'évènement d'insertion de l'élément P dans le gène *latran*.

Malgré la tendance des éléments P à se relocaliser prioritairement près de leur site de départ, une mutagenèse basée sur leur mobilisation est aléatoire. De fait, il doit être possible d'obtenir une insertion dans notre gène d'intérêt, mais cette fin nécessiterait un nombre bien supérieur de croisements et l'établissement de bien plus de lignées que nous ne l'avions estimé. En pratique, on remarque que les éléments P ont des sites d'insertion privilégiés appelés «hot spot». Un exemple concerne précisément la région promotrice de *dome* pour laquelle un grand nombre de lignées P différentes sont disponibles. De même, on remarque que certaines régions sont réfractaires à une insertion de l'élément P, ce qui pourrait être le cas de *latran* car nos conditions de mutagenèse étaient favorables à une insertion.

Nous avons alors opté pour une approche différente qui permet de générer une délétion précise du gène d'intérêt par recombinaison homologue. Cette approche a l'inconvénient d'être assez longue, elle combine l'établissement de lignées transgéniques et plusieurs étapes de croisements successifs. Néanmoins elle assure théoriquement une plus grande garantie de résultats.

B. Invalidation du gène *latran* par recombinaison homologue

1. Le Knock-Out chez la souris

La procédure dite de Knock-Out chez la souris consiste à insérer une mutation, ou un gène rapporteur, dans la séquence d'un gène cible de façon à le rendre inactif. Pour cette technique, on utilise les cellules souches embryonnaires ES, qui sont transformées par un plasmide contenant la séquence modifiée du gène cible et appelé fragment donneur. Par une recombinaison homologue, le fragment donneur va prendre la place de l'allèle sauvage dans le noyau de certaines cellules ES transformées. Une fois les cellules recombinantes ES sélectionnées, elles sont réimplantées dans un blastocyte, qui est implanté dans une femelle pour la gestation. Les cellules ES sont pluripotentes, ce qui signifie qu'elles sont capables de se différencier en tous les types cellulaires de la souris adulte y compris les cellules germinales. Les cellules manipulées se divisent, puis se développent dans différents tissus du souriceau, donnant naissance à une souris chimère. Lorsque cette souris se reproduit, on recherche dans la progéniture les souris provenant des gamètes issus des cellules ES modifiées. Par croisement, il est ensuite possible de produire un mutant nul homozygote ayant perdu la fonction du gène inactivé.

2. Application de cette technique chez la drosophile pour la délétion de *latran*

Cette stratégie de KO n'est pas applicable au modèle de la drosophile pour les raisons suivantes a) il n'existe aucune lignée de cellules souches embryonnaires multipotentes chez la drosophile. La première étape de modification *ex vivo* n'est donc pas possible, et b) la réimplantation de cellules modifiées dans l'ovaire des drosophiles adultes est également impossible. Cependant, une approche alternative pour générer des KO par recombinaison homologue a été décrite récemment (Gong and Golic, 2003; Rong and Golic, 2000). L'inconvénient était d'introduire le fragment donneur dans les cellules germinales pour que la recombinaison puisse se faire. L'innovation provient de l'idée de produire *in vivo* le fragment donneur directement dans les cellules des mouches.

Pour les recombinaisons «ends-out» classiques, le gène d'intérêt est invalidé par l'insertion dans sa séquence d'un gène rapporteur, qui permet également la sélection des événements de recombinaison. Pour ma part, j'ai utilisé une technique basée sur la recombinaison «ends-out» pour générer une délétion complète du gène *latran* (Gong and Golic, 2004). Cette technique s'opère en plusieurs étapes, que je vais décrire dans la suite.

a. Clonage du transgène donneur

Le fragment donneur doit renfermer des régions d'homologie du gène que l'on désire inactiver. Dans cette méthode, la région d'homologie du fragment donneur ne correspond pas à la séquence ciblée sur le génome. Deux régions d'homologie sont en fait utilisées, qui correspondent aux séquences flanquantes du gène à déléter (en 5' et 3') (Figure 18). Lors de la recombinaison, les séquences d'homologie vont se substituer en entraînant le gène rapporteur *mini-white* dans le génome et en provoquant la délétion du gène *latran*.

Le vecteur de transgénèse pW25 (don de François Karch, Genève) correspond au vecteur de transformation pCaSpeR, dérivé de l'élément P, qui a été modifié pour l'application décrite ci-dessus (Gong and Golic, 2004). Des séquences FRT et les sites de coupure pour la méganucléase I-*SceI* ont été intégrés au vecteur. Les régions génomiques flanquantes du gène *latran*, d'une taille de 4 kb chacune, ont été clonées de part et d'autre du gène rapporteur *mini-white* (Figure 18).

Les sites FRT aux extrémités de la construction permettront par la suite d'extraire le fragment donneur du génome de la drosophile, sous l'action de l'enzyme flipase (FLP), et de générer une molécule extrachromosomique circulaire. Le site de coupure I-*SceI*, digéré par la méganucléase de levure du même nom, permettra de linéariser la molécule double brin

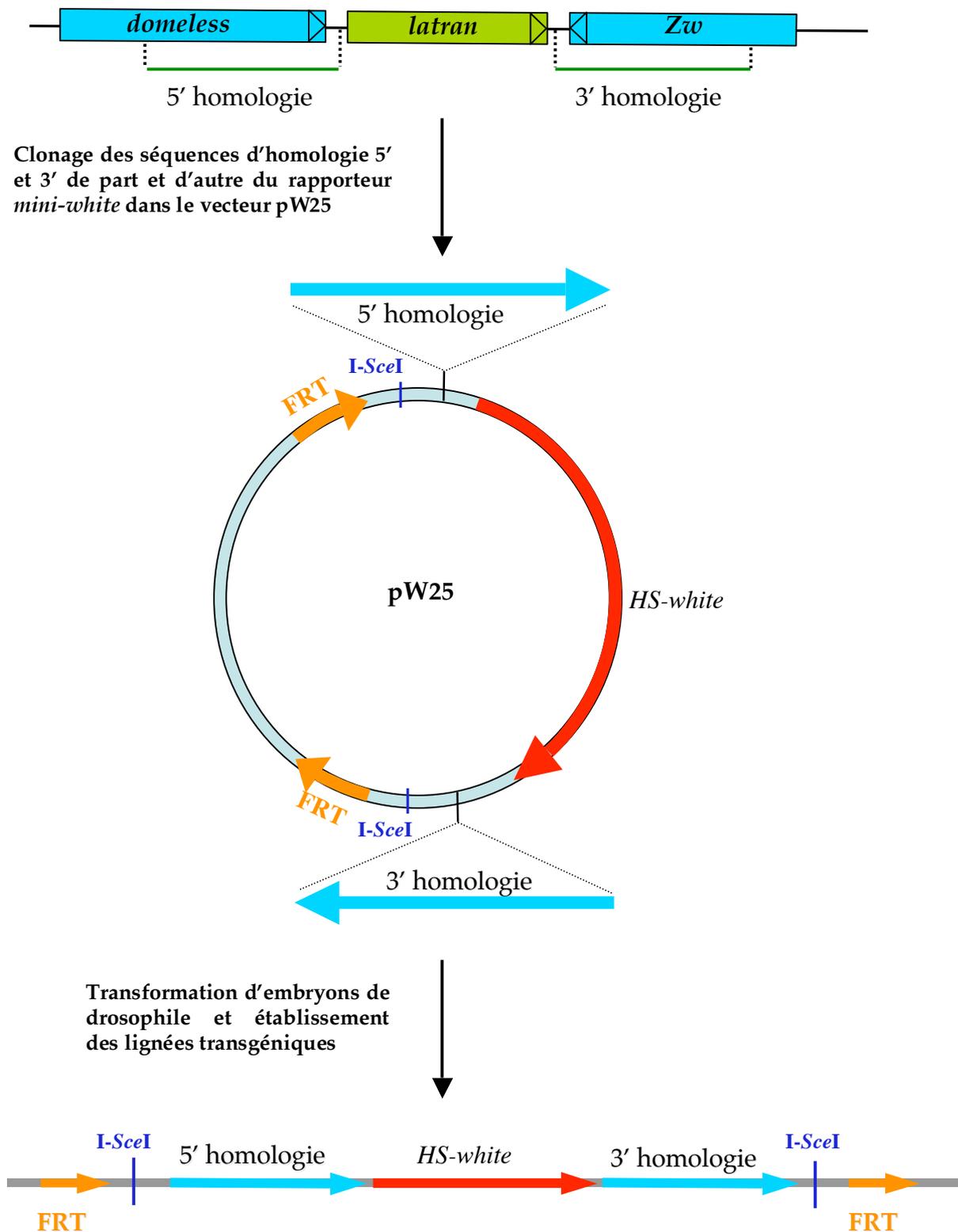


Figure 18: Clonage du fragment donneur pour la recombinaison homologue.

Les séquences de 4 kb flanquant le gène *latran* sont insérées dans le vecteur pW25, de part et d'autre du gène rapporteur *mini-white*. Ce vecteur est ensuite injecté à des embryons de drosophile pour établir les lignées transgéniques qui portent le fragment donneur pour la recombinaison (voir texte pour détails).

circulaire. Il est nécessaire de préciser à ce niveau qu'aucun site endogène pour la méganucléase I-*SceI* n'existe dans le génome de la drosophile.

b. La recombinaison et le crible des recombinants

Le vecteur pW25 dans lequel j'ai cloné les régions flanquantes de *latran* a été injecté à des embryons de drosophile de façon à établir des lignées transgéniques. Du fait de la taille importante du transgène à insérer dans le génome de la drosophile, l'efficacité de transformation fut faible. Néanmoins, nous avons obtenu trois lignées indépendantes deux lignées pour lesquelles les transgènes sont localisés sur le chromosome II, ainsi qu'une lignée avec une insertion sur le chromosome III. Plusieurs étapes sont nécessaires pour provoquer la recombinaison et générer les lignées mutantes

- 1- Les lignées transgéniques ont été croisées avec une lignée portant les gènes de la FLP et de la méganucléase I-*SceI* sous le contrôle d'un promoteur inductible par la chaleur. Les larves issues de ce croisement ont été exposées à un choc thermique (37°C, 90 minutes) pour induire l'expression des enzymes FLP et I-*SceI*.
- 2- Nous avons récupéré au stade adulte les femelles vierges qui portent le chromosome donneur et le chromosome de la construction FLP et I-*SceI*. La majorité de ces femelles présentaient des yeux *white*, traduisant l'activité de la FLP. Chez certaines femelles, quelques ommatidies de l'œil sont restées rouges, une coloration très certainement causée par la non excision du fragment donneur dans ces cellules. A cette étape, la linéarisation et/ou la recombinaison peuvent ne pas se produire. Pour sélectionner les événements d'intégration du fragment donneur à la place de *latran*, ces femelles ont ensuite été croisées avec une lignée qui exprime une FLP constitutive.
- 3- Si l'évènement d'intégration est bon, l'excision des fragments donneurs ne peut plus se faire car les séquences FRT sont perdues lors de la recombinaison (Figure 19). Ainsi, le rapporteur *mini-white* ne peut être excisé, et il faut rechercher dans la descendance les mouches mâles et femelles qui ont les yeux colorés. Ces croisements sont en cours.
- 4- Lors de ce dernier croisement, des évènements de recombinaison accidentelle peuvent engendrer des répétitions en tandem du fragment donneur. Les lignées établies devront être testées par une stratégie de PCR ou par Southern Blot pour vérifier la délétion du gène *latran*.

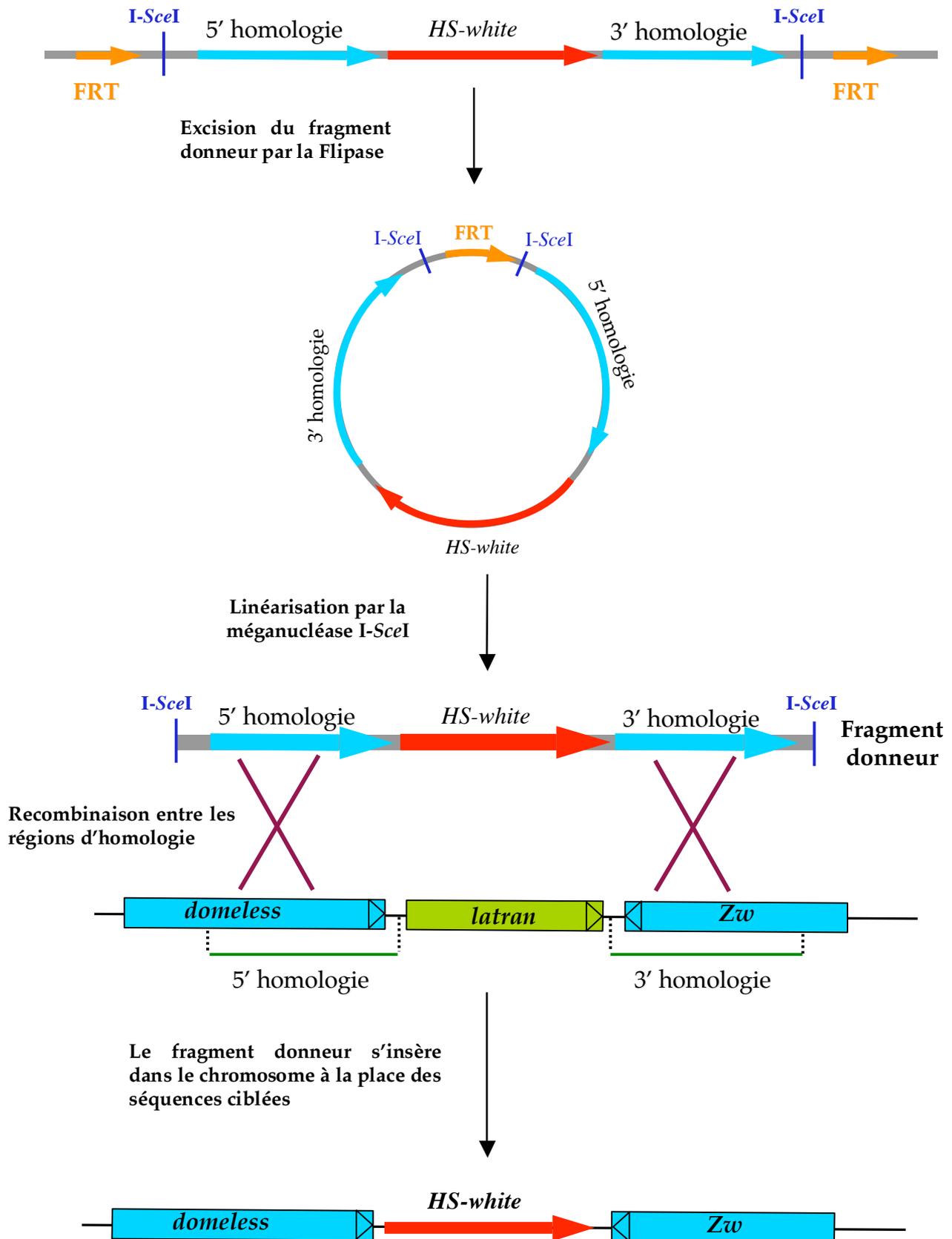


Figure 19: Délétion du gène *latran* par recombinaison homologue. Le fragment donneur est excisé et linéarisé sous l'action des enzymes flipase et I-SceI. Dans la lignée germinale d'une fraction de mouches, les régions d'homologie du fragment donneur vont se substituer aux régions homologues dans l'ADN génomique. La recombinaison entraîne la délétion du gène *latran*, qui est remplacé par le rapporteur *mini-white*.

Une fois qu'un mutant sera isolé, que la délétion sera démontrée moléculairement et que la lignée sera établie, il ne restera plus qu'à tester ses capacités à différencier les lamellocytes en réponse à une infection parasitaire.

3. Fréquence des évènements de recombinaison

Gong et Golic, qui ont élaboré cette technique, ont démontré qu'une mutagenèse ciblée par la technique de recombinaison «*ends-out*» chez la drosophile est assez efficace pour permettre son utilisation. Ils ont calculé que le taux de remplacement d'une séquence cible par un gène rapporteur est d'environ un événement pour 400 gamètes. Cette fréquence de recombinaison peut paraître basse, mais cette technique est tout à fait réalisable avec le modèle drosophile, qui est adapté à ces techniques d'études. En effet, un crible peut être réalisé chez la drosophile en croisant en masse plusieurs femelles vierges et mâles du bon génotype. Le grand nombre de mouches dans chaque descendance permet un crible rapide, d'autant plus que le rapporteur utilisé, ici la couleur de l'œil, est facilement identifiable.

IV. Discussion et perspectives

Malgré les études préliminaires que nous avons réalisées sur *latran* et *dome*, il est difficile, à l'heure actuelle, d'apporter une conclusion sur leur rôle dans les processus hématopoïétiques larvaires. Du fait que les mutants *dome* sont létaux embryonnaires, et qu'aucun mutant pour *latran* n'était disponible, nous avons abordé le sujet par une approche de surexpression et une approche RNAi. Dans ces expériences, nous n'avons observé aucun effet sur la différenciation des lamellocytes en réponse à une infection par *L. bouvardi*. Cependant, ce type d'étude présente de nombreuses limitations qui peuvent expliquer à elles seules l'absence des phénotypes recherchés.

Les expériences de RNAi et les surexpressions de formes DN permettent de générer uniquement des mutations hypomorphes. En effet, bien que les formes DN agissent en titrant le ligand, il subsistera toujours quelques interactions entre le ligand et son récepteur natif, permettant la transmission d'un signal intracytoplasmique. De même, la destruction des messagers par la technique des RNAi n'est pas totale, et les transcrits «*échappés*» *latran* pourraient permettre la synthèse d'une quantité suffisante de protéine pour répondre au signal S2. Cette hypothèse serait d'autant plus envisageable que la protéine transmembranaire peut être stable et sa demi-vie longue. Il est possible qu'une diminution même substantielle de l'activité des récepteurs Dome et Latran ne suffise pas à abolir leur fonction. Dans ce cas de figure, une activité résiduelle suffirait à assurer

la transmission du signal dans la cellule, lequel peut être pris en charge et amplifié par les voies de signalisation intracellulaires. Nous nous trouverions ainsi dans une situation du «tout ou rien» où uniquement la perte totale de fonction nous renseignerait de façon non-équivoque sur les rôles de Dome et Latran. Un exemple précis illustrant ce type de situation concerne la protéase Perséphone, impliquée dans la cascade protéolytique activatrice de la voie Toll. Un RNAi dirigé contre les transcrits *psh* ne suffit pas à bloquer l'activation de la voie Toll en cas d'infection microbienne car la cascade protéolytique amplifie le signal en aval (JM. Reichhart, communications personnelles).

La surexpression de Dome dans les prohémyocytes provoque l'apparition de lamellocytes en circulation, ce qui prouve que Dome peut activer la voie JAK/STAT dans ces cellules. Cependant, des études ont montré que la surexpression de Dome dans plusieurs tissus embryonnaires ne provoque pas l'activation de la voie JAK/STAT (Brown et al., 2003). La formation des homodimères Dome y est indépendante de la liaison au ligand Upd et confère uniquement à ces tissus la compétence à répondre au ligand. L'interaction de Dome avec son ligand est indispensable pour la signalisation. La différenciation de lamellocytes lors de la surexpression de Dome dans la glande de la lymphé n'est pas en accord avec ce mode d'activation et suggère que celui-ci puisse être différent dans ce tissu. Un fort niveau d'expression de Dome pourrait induire son homodimérisation constitutive à la surface des prohémyocytes, et constituer une modification suffisante pour activer la voie JAK/STAT et le programme de différenciation des lamellocytes.

Si Latran répond au même mode d'activation que Dome dans les tissus embryonnaires, sa simple surexpression ne suffira pas à activer les voies qu'il contrôle. Dans l'hypothèse que Latran est impliqué dans la différenciation des lamellocytes, ce mode de fonctionnement explique aisément l'absence de phénotype lors de sa surexpression. Des études supplémentaires sont à l'évidence nécessaire pour élucider l'implication réelle de *dome* et *latran* dans la différenciation des lamellocytes.

Pour l'étude de Dome, une alternative est d'utiliser les mutations perte-de-fonction pour générer des clones mitotiques dans la glande de la lymphé. Ces clones mitotiques *dome* peuvent être obtenus par le système recombinaison FLP/FRT. Des expériences tests ont mis en évidence qu'il est difficile, mais néanmoins possible, d'obtenir des clones recombinants dans la glande de la lymphé. Le but est de déterminer si les prohémyocytes des clones mitotiques *dome* gardent leur capacité à se différencier en lamellocytes suite à une infection par *L. bouvardi*. A cette étape, il est impératif de pouvoir reconnaître dans la glande de la lymphé les cellules du clone mutant et les lamellocytes. Les cellules mutantes seront reconnues par l'absence de GFP (Green Fluorescent Protein) dans un contexte GFP⁺. Les lamellocytes devront être identifiés par immunohistochimie.

Le problème pour une telle étude provient du fait que nous ne disposons pas pour le moment d'anticorps marqueur de lamellocytes. Je me suis donc proposé de produire un anticorps qui nous permettra de réaliser ces expériences. Nous avons identifié l'intégrine □PS4 comme un marqueur spécifique des lamellocytes (Chapitre I, Article I) et j'ai choisi de produire l'anticorps contre cette protéine. Les intégrines de la drosophile sont peu nombreuses et présentent de grandes homologies de séquences. Par des alignements, j'ai identifié une courte séquence de 48 acides aminés spécifique de l'intégrine □PS4, que j'ai alors choisie pour produire un antigène. J'ai produit en masse une protéine de fusion GST-Ag(□PS4) en système bactérien, que j'ai ensuite purifiée et digérée pour isoler le peptide antigénique. Ce peptide est en cours d'injection à des lapins et nous espérons qu'un anticorps spécifique des lamellocytes pourra être purifié à partir du sérum.

Si Latran est impliqué dans la différenciation des lamellocytes est juste, il sera d'une grande utilité de disposer d'un anticorps spécifique contre ce récepteur. J'ai ainsi produit, en parallèle à □PS4, un polypeptide correspondant à la partie intracellulaire de Latran que j'ai ensuite purifié. Ici encore, le peptide est en cours d'injection à des lapins. Un anticorps spécifique contre Latran nous permettra des expériences d'immunohisto- et cytochimie, mais également de biochimie pour des (co-)immunoprécipitations et pour identifier ses partenaires.

Nous avons vu que les récepteurs Latran et Dome ont des caractéristiques structurales très intéressantes qui nous interpellent sur leur(s) fonction(s) potentielle(s) dans l'hématopoïèse. Si, de fait, ces récepteurs ne sont pas impliqués dans le mécanisme pour lequel nous les avons étudiés, leur expression conjointe dans les prohémoctes de la glande de la lymphe devrait néanmoins refléter une fonction dans ces cellules. Il sera alors important de rechercher ces fonctions. Le mutant *latran* qui est en cours de génération, les clones mitotiques pour *dome* ainsi que les anticorps en cours de production seront des outils indispensables pour ces recherches. A terme, il sera intéressant de déterminer le mode de fonctionnement de ces deux récepteurs homologues des IL-6R de mammifères, c'est-à-dire savoir si ceux-ci agissent uniquement en tant qu'homodimères, ou bien si un hétérodimère des deux récepteurs est fonctionnel.

Des investigations sont menées en parallèle dans notre équipe pour tenter d'identifier les ligands qui peuvent lier Dome et/ou Latran dans les prohémoctes. Nous nous sommes pour le moment intéressés aux ligands connus de Dome □ la famille des Upd (Upd, Upd2 et Upd3). Les travaux sont préliminaires et ne nous permettent pas, pour le moment, de les impliquer dans la différenciation des lamellocytes. Upd3 nous paraît un candidat particulièrement intéressant car une étude a montré que le pilote *upd3-gal4* conduit une forte expression dans les cellules du PSC (Jung et al., 2005).

L'ensemble de ce travail est mené en proche collaboration avec l'équipe toulousaine d'Alain Vincent et Michèle Crozatier. Ils ont récemment identifié un gène candidat pour le récepteur R1. Ce récepteur est exprimé spécifiquement par les cellules du PSC et cette expression diminue chez les mutants *col*. Ce récepteur est actuellement à l'étude dans leur équipe, selon des approches similaires aux nôtres.

-DISCUSSION GENERALE-

Les travaux que j'ai développés au cours de mes trois années de thèse ont procuré des informations sur deux thèmes centraux : l'activité transcriptionnelle des hémocytes de la drosophile, et la régulation génétique de la différenciation des lamellocytes suite à une infection parasitaire.

En premier lieu, l'établissement du transcriptome des différentes populations hémocytaires nous permet d'avoir aujourd'hui une vue plus précise et plus étendue des activités transcriptionnelles des hémocytes et de leurs fonctions. Les puces nous fournissent des indications pour identifier, par exemple, des marqueurs moléculaires ou les effecteurs possibles de la réponse antibactérienne des cellules sanguines. Elles nous procurent également des indications sur les voies de signalisation qui peuvent être impliquées dans les différentes fonctions des hémocytes, telles que la phagocytose, la mélanisation et l'encapsulation. En ce sens, nous avons établi une banque d'information qui servira comme base de référence pour les études futures sur les cellules sanguines de la drosophile.

On observe un intérêt grandissant de la communauté scientifique pour les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse de la drosophile depuis que de nombreuses similitudes génétiques et développementales avec celle des mammifères ont été mises en évidence. Nos travaux sur le rôle du transactivateur Collier dans la spécification du lignage lamellocyte soulignent une fois encore les nombreuses ressemblances que nous pouvons trouver entre ces deux systèmes hématopoïétiques. Nous avons apporté de nouvelles informations en démontrant que les molécules de type Col/EBF permettent de spécifier, aussi bien chez la drosophile que chez les mammifères, des cellules sanguines qui présentent des caractères adaptatifs. L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude nous a mené à proposer un modèle de réponse à une infection parasitaire qui met en œuvre un mécanisme plus sophistiqué que celui imaginé auparavant, à savoir une intégration en plusieurs étapes du signal d'infection par plusieurs types de cellules, qui aboutit à la différenciation des pro-hémocytes en lamellocytes.

La poursuite de ce travail nous a conduits à l'étude de deux récepteurs homologues des récepteurs IL-6R de mammifères, codés par les gènes *domeless* et *CG14225*, lequel n'a pour le moment pas été caractérisé. Des études préliminaires nous suggèrent que ces récepteurs pourraient être impliqués dans les mécanismes moléculaires qui permettent la différenciation des lamellocytes suite à une infection parasitaire. J'ai développé des outils pour analyser l'implication de ces deux gènes dans ce processus. J'ai également généré des pertes-de-fonction pour *CG14225* et les lignées sont en cours d'établissement. Nous espérons à terme pouvoir déterminer le rôle de ces récepteurs dans l'hématopoïèse de la drosophile.

Références bibliographiques

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., and Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 5, 441-450.
- Agarwala, K. L., Kawabata, S., Miura, Y., Kuroki, Y., and Iwanaga, S. (1996). Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *J Biol Chem* 271, 23768-23774.
- Alfonso, T. B., and Jones, B. W. (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* 248, 369-383.
- Amaya, K. E., Asgari, S., Jung, R., Hongskula, M., and Beckage, N. E. (2005). Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. *J Insect Physiol* 51, 505-512.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C. R. (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163, 203-215.
- Ashida, M., and Brey, P. T. (1997). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In *Molecular Mechanisms of Immune Response in insects*, P. T. Brey, and D. Hultmark, eds. (London, Chapman & Hall), pp. 135-172.
- Bartholdy, B., and Matthias, P. (2004). Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* 327, 1-23.
- Belvin, M. P., and Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 393-416.
- Benassi, V., Frey, F., and Carton, Y. (1998). A new specific gene for wasp cellular immune resistance in *Drosophila*. *Heredity* 80 (Pt 3), 347-352.
- Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., and Wetzler, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 101, 2940-2954.
- Bernardoni, R., Vivancos, B., and Giangrande, A. (1997). *glide/gcm* is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev Biol* 191, 118-130.
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., and Darnell, J. E., Jr. (2001). A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9563-9568.
- Binari, R., and Perrimon, N. (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev* 8, 300-312.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A., and Royet, J. (2004). Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* 5, 1175-1180.
- 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.
- Brown, S., Hu, N., and Hombria, J. C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* 11, 1700-1705.

- Brown, S., Hu, N., and Hombria, J. C. (2003). Novel level of signalling control in the JAK/STAT pathway revealed by in situ visualisation of protein-protein interaction during *Drosophila* development. *Development* *130*, 3077-3084.
- Bruckner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C. M., Rorth, P., and Perrimon, N. (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev Cell* *7*, 73-84.
- Busslinger, M., Nutt, S. L., and Rolink, A. G. (2000). Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* *12*, 151-158.
- Callus, B. A., and Mathey-Prevot, B. (2002). SOCS36E, a novel *Drosophila* SOCS protein, suppresses JAK/STAT and EGF-R signalling in the imaginal wing disc. *Oncogene* *21*, 4812-4821.
- Carton, Y., Bouletreau, M., van Lenteren, J. C., and van Alphen, J. C. M. (1986). The *Drosophila* parasitic wasps. In *The genetics and biology of Drosophila*, M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N. Thompson, eds. (New York, Academic Press), pp. 347-394.
- Carton, Y., and Nappi, A. J. (1997). *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* *13*, 218-227.
- Carton, Y., and Nappi, A. J. (2001). Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* *52*, 157-164.
- Carton, Y., Nappi, A. J., and Poirie, M. (2005). Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Dev Comp Immunol* *29*, 9-32.
- Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S., and Hou, S. X. (2002). mom identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev* *16*, 388-398.
- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., and Krasnow, M. A. (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* *108*, 865-876.
- Choe, K. M., Lee, H., and Anderson, K. V. (2005). *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 1122-1126.
- 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.
- Christensen, B. M., Li, J., Chen, C. C., and Nappi, A. J. (2005). Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol* *21*, 192-199.
- Clauss, M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* *26*, 561-569.
- Coffman, J. A. (2003). Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int* *27*, 315-324.
- Crozatier, M., Glise, B., and Vincent, A. (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser. *Development* *129*, 4261-4269.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibensouda, S., and Vincent, A. (1996). Collier, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol* *6*, 707-718.

- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibensouda, S., and Vincent, A. (1999). Head versus trunk patterning in the *Drosophila* embryo; Collier requirement for formation of the intercalary segment. *Development* *126*, 4385-4394.
- Crozatier, M., and Vincent, A. (1999). Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to Notch signalling. *Development* *126*, 1495-1504.
- 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.
- Dearolf, C. R. (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta* *1377*, M13-23.
- 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.
- Dubois, L., and Vincent, A. (2001). The COE--Collier/Olf1/EBF--transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. *Mech Dev* *108*, 3-12.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* *107*, 17-26.
- Dushay, M. S., Asling, B., and Hultmark, D. (1996). Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10343-10347.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M., and Royet, J. (2002). Notch Signaling Controls Lineage Specification during *Drosophila* Larval Hematopoiesis. *Curr Biol* *12*, 1923-1927.
- Ernst, M., and Jenkins, B. J. (2004). Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* *20*, 23-32.
- Espagne, E., Dupuy, C., Huguet, E., Cattolico, L., Provost, B., Martins, N., Poirie, M., Periquet, G., and Drezen, J. M. (2004). Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* *306*, 286-289.
- Evans, C. J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* *5*, 673-690.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* *9*, 669-676.
- Fessler, L. I., Nelson, R. E., and Fessler, J. H. (1994). *Drosophila* extracellular matrix. *Methods Enzymol* *245*, 271-294.
- Forton, K. F., Christensen, B. M., and Sutherland, D. R. (1985). Ultrastructure of the melanization response of *Aedes trivittatus* against inoculated *Dirofilaria immitis* microfilariae. *J Parasitol* *71*, 331-341.

- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S. H., and Schulz, R. A. (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 11451-11456.
- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H., and Schulz, R. A. (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7342-7347.
- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R. A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* *4*, 431-443.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* *284*, 1991-1994.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Iwanaga, S., and Ohnishi, E. (1995). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7769-7773.
- Gateff, E. (1977). Malignant neoplasms of the hematopoietic system in three mutants of *Drosophila melanogaster*. *Ann Parasitol Hum Comp* *52*, 81-83.
- Gateff, E. (1994). Tumor-suppressor genes, hematopoietic malignancies and other hematopoietic disorders of *Drosophila melanogaster*. *Ann N Y Acad Sci* *712*, 260-279.
- Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballes, F., Medioni, C., Cerezo, D., and Noselli, S. (2002). The *Drosophila* cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. *Development* *129*, 5437-5447.
- Gilbert, M. M., Weaver, B. K., Gergen, J. P., and Reich, N. C. (2005). A novel functional activator of the *Drosophila* JAK/STAT pathway, unpaired2, is revealed by an in vivo reporter of pathway activation. *Mech Dev* *122*, 939-948.
- 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.
- Godfray, H. C. (2004). Parasitoids. *Curr Biol* *14*, R456.
- Gong, W. J., and Golic, K. G. (2003). Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2556-2561.
- Gong, W. J., and Golic, K. G. (2004). Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* *168*, 1467-1476.
- Goto, A., Kadowaki, T., and Kitagawa, Y. (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol* *264*, 582-591.
- 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.
- Grotzinger, J. (2002). Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim Biophys Acta* *1592*, 215-223.
- Guo, X., Beerntsen, B. T., Zhao, X., and Christensen, B. M. (1995). Hemocyte alterations during melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito *Armigeres subalbatus*. *J Parasitol* *81*, 200-207.

- Harrison, D. A., Binari, R., Stines Nahreini, T., Gilman, M., and Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *Embo J* *14*, 2857-2865.
- Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M., and Perrimon, N. (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev* *12*, 3252-3263.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M. S., 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*. *Mol Cell* *4*, 827-837.
- Heino, T. I., Karpanen, T., Wahlstrom, G., Pulkkinen, M., Eriksson, U., Alitalo, K., and Roos, C. (2001). The *Drosophila* VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mech Dev* *109*, 69-77.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* *374*, 1-20.
- Hillyer, J. F., and Christensen, B. M. (2002). Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem Cell Biol* *117*, 431-440.
- Hita, M. T., Poirie, M., Leblanc, N., Lemeunier, F., Lutcher, F., Frey, F., Periquet, G., and Carton, Y. (1999). Genetic localization of a *Drosophila melanogaster* resistance gene to a parasitoid wasp and physical mapping of the region. *Genome Res* *9*, 471-481.
- Hoch, R. V., and Soriano, P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development* *130*, 4769-4784.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313-1318.
- Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* *3*, 121-126.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* *130*, 4955-4962.
- Hombria, J. C., and Brown, S. (2002). The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* *12*, R569-575.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K., and Hotta, Y. (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* *82*, 1025-1036.
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X., and Perrimon, N. (2002). The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev Cell* *3*, 765-778.
- 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.
- Ip, Y. T., Reach, M., Engstrom, 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.
- Iritani, B. M., Forbush, K. A., Farrar, M. A., and Perlmutter, R. M. (1997). Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *Embo J* *16*, 7019-7031.

- 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.
- Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. A., Moore, K. A., and Lemischka, I. R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601-604.
- Iwanaga, S. (1993). The limulus clotting reaction. *Curr Opin Immunol* 5, 74-82.
- Iwanaga, S., and Kawabata, S. (1998). Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front Biosci* 3, D973-984.
- Johansson, K. C., Metzendorf, C., and Soderhall, K. (2005). Microarray analysis of immune challenged *Drosophila* hemocytes. *Exp Cell Res* 305, 145-155.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G., and Goodman, C. S. (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82, 1013-1023.
- Jung, S. H., Evans, C. J., Uemura, C., and Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132, 2521-2533.
- Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E., and Steiner, H. (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10078-10082.
- Karlsson, C., Korayem, A. M., Scherfer, C., Loseva, O., Dushay, M. S., and Theopold, U. (2004). Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *J Biol Chem* 279, 52033-52041.
- Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2000). Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* 275, 32721-32727.
- Korayem, A. M., Fabbri, M., Takahashi, K., Scherfer, C., Lindgren, M., Schmidt, O., Ueda, R., Dushay, M. S., and Theopold, U. (2004). A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 1297-1304.
- Kwon, T. H., Kim, M. S., Choi, H. W., Joo, C. H., Cho, M. Y., and Lee, B. L. (2000). A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 267, 6188-6196.
- Labrosse, C., Carton, Y., Dubuffet, A., Drezen, J. M., and Poirie, M. (2003). Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J Insect Physiol* 49, 513-522.
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J. M., and Poirie, M. (2005). A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 93-103.
- 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.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 230, 243-257.

- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288, 146-149.
- Lebestky, T., Jung, S. H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis. *Genes Dev* 17, 348-353.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996a). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996b). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1997). Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14614-14619.
- Lenny, N., Westendorf, J. J., and Hiebert, S. W. (1997). Transcriptional regulation during myelopoiesis. *Mol Biol Rep* 24, 157-168.
- 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 Rep* 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. 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.
- Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J. A., and Ehret-Sabatier, L. (2004). Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of Drosophila. *Biochimie* 86, 607-616.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002a). Activation of Drosophila Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* 297, 114-116.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., Jiang, H., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002b). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of Drosophila. *Embo J* 21, 6330-6337.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376, 263-267.
- Loseva, O., and Engstrom, Y. (2004). Analysis of signal-dependent changes in the proteome of Drosophila blood cells during an immune response. *Mol Cell Proteomics* 3, 796-808.

- 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.
- Luo, H., Hanratty, W. P., and Dearolf, C. R. (1995). An amino acid substitution in the Drosophila hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J* *14*, 1412-1420.
- Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., and Nakanishi, Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* *279*, 48466-48476.
- Mandal, L., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* *36*, 1019-1023.
- Manfrulli, P., Reichhart, J. M., Steward, R., Hoffmann, J. A., and Lemaitre, B. (1999). A mosaic analysis in Drosophila fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. *Embo J* *18*, 3380-3391.
- Meister, M., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (2000). The antimicrobial host defense of Drosophila. *Curr Top Microbiol Immunol* *248*, 17-36.
- Meng, X., Khanuja, B. S., and Ip, Y. T. (1999). Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes Dev* *13*, 792-797.
- Michalakis, Y., and Hochberg, M. E. (1994). Parasitic effects on host life-history traits: a review of recent studies. *Parasite* *1*, 291-294.
- 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.
- Miura, Y., Kawabata, S., and Iwanaga, S. (1994). A Limulus intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem* *269*, 542-547.
- Miura, Y., Kawabata, S., Wakamiya, Y., Nakamura, T., and Iwanaga, S. (1995). A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *J Biol Chem* *270*, 558-565.
- Mizuguchi, K., Parker, J. S., Blundell, T. L., and Gay, N. J. (1998). Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle. *Trends Biochem Sci* *23*, 239-242.
- Mohler, J., Seecoomar, M., Agarwal, S., Bier, E., and Hsai, J. (2000). Activation of knot (kn) specifies the 3-4 intervein region in the Drosophila wing. *Development* *127*, 55-63.
- Molkentin, J. D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* *275*, 38949-38952.
- Munier, A. I., Doucet, D., Perrodou, E., Zachary, D., Meister, M., Hoffmann, J. A., Janeway, C. A., Jr., and Lagueux, M. (2002). PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in Drosophila larvae. *EMBO Rep* *3*, 1195-1200.
- Muta, T., Hashimoto, R., Miyata, T., Nishimura, H., Toh, Y., and Iwanaga, S. (1990). Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes. cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localization. *J Biol Chem* *265*, 22426-22433.
- Muta, T., Oda, T., and Iwanaga, S. (1993). Horseshoe crab coagulation factor B. A unique serine protease zymogen activated by cleavage of an Ile-Ile bond. *J Biol Chem* *268*, 21384-21388.

- 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 defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity* *17*, 575-581.
- Nappi, A. J., and Vass, E. (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res* *6*, 117-126.
- 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.
- Nappi, A. J., Vass, E., Malagoli, D., and Carton, Y. (2004). The effects of parasite-derived immune-suppressive factors on the cellular innate immune and autoimmune responses of *Drosophila melanogaster*. *J Parasitol* *90*, 1139-1149.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G., and Fessler, J. H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *Embo J* *13*, 3438-3447.
- O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* *11*, 21-31.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., and Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* *109 Suppl*, S121-131.
- Orkin, S. H. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol* *42*, 927-934.
- Pearson, A., Lux, A., and Krieger, M. (1995). Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4056-4060.
- Perrimon, N., and Mahowald, A. P. (1986). *l(1)hopscotch*, A larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in *Drosophila*. *Dev Biol* *118*, 28-41.
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2004). In vivo RNAi analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem*.
- Poirie, M., Frey, F., Hita, M., Huguet, E., Lemeunier, F., Periquet, G., and Carton, Y. (2000). *Drosophila* resistance genes to parasitoids: chromosomal location and linkage analysis. *Proc Biol Sci* *267*, 1417-1421.
- Portin, P. (2002). General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *Drosophila melanogaster*: a review. *Hereditas* *136*, 89-96.
- Provost, B., Varricchio, P., Arana, E., Espagne, E., Falabella, P., Huguet, E., La Scaleia, R., Cattolico, L., Poirie, M., Malva, C., *et al.* (2004). Bracoviruses contain a large multigene family coding for protein tyrosine phosphatases. *J Virol* *78*, 13090-13103.
- Qiu, P., Pan, P. C., and Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* *125*, 1909-1920.
- Querfurth, E., Schuster, M., Kulesa, H., Crispino, J. D., Doderlein, G., Orkin, S. H., Graf, T., and Nerlov, C. (2000). Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* *14*, 2515-2525.

- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., and Manfruegli, P. (2002a). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* *241*, 145-156.
- Ramet, M., Manfruegli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R. A. (2002b). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* *416*, 644-648.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfruegli, 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.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M., and Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* *122*, 4023-4031.
- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P., and Randsholt, N. (2002). Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the multi sex combs gene. *Genetics in press*.
- Rizki, T. M. (1978). The circulatory system and associated cells and tissues. In *Genetics and Biology of Drosophila*, M. Ashburner, and T. R. F. Wright, eds. (New York, Academic Press), pp. 397-452.
- Rizki, T. M., and Rizki, R. M. (1984). The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In *Insect ultrastructure*, R. C. King, and H. Akai, eds. (New York, Plenum Publishing Corporation), pp. 579-604.
- Rizki, T. M., Rizki, R. M., and Grell, E. H. (1980). A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm's Roux's Archives* *188*, 91-99.
- Rong, Y. S., and Golic, K. G. (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* *288*, 2013-2018.
- Russo, J., Brehelin, M., and Carton, Y. (2001). Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J Insect Physiol* *47*, 167-172.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., and Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* *112* (Pt 1), 135-142.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Hetru, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000a). The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* *12*, 569-580.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Hetru, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000b). The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* *12*, 569-580.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000c). Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat Immunol* *1*, 342-347.
- Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* *168*, 1542-1546.
- Samakovlis, C., Asling, B., Boman, H. G., Gateff, E., and Hultmark, D. (1992). In vitro induction of cecropin genes--an immune response in a *Drosophila* blood cell line. *Biochem Biophys Res Commun* *188*, 1169-1175.

- Scherfer, C., Karlsson, C., Loseva, O., Bidla, G., Goto, A., Havemann, J., Dushay, M. S., and Theopold, U. (2004). Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol* *14*, 625-629.
- Schindler, C. W. (2002). Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* *109*, 1133-1137.
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D., and Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* *14*, 2461-2471.
- Sorrentino, R. P., Melk, J. P., and Govind, S. (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* *166*, 1343-1356.
- Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., and Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep* *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- κ B 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.
- 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.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S. (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *Embo J* *23*, 4690-4700.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol* *3*, 91-97.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* *120*, 1829-1837.
- Theopold, U., Schmidt, O., Soderhall, K., and Dushay, M. S. (2004). Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol* *25*, 289-294.
- Thomas, F., Poulin, R., Guegan, J. F., Michalakis, Y., and Renaud, F. (2000). Are there pros as well as cons to being parasitized? *Parasitol Today* *16*, 533-536.
- Tirouvanziam, R., Davidson, C. J., Lipsick, J. S., and Herzenberg, L. A. (2004). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2912-2917.
- Tower, J., Karpen, G. H., Craig, N., and Spradling, A. C. (1993). Preferential transposition of *Drosophila* P elements to nearby chromosomal sites. *Genetics* *133*, 347-359.
- Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B., and Orkin, S. H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* *12*, 1176-1188.

- Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M., and Orkin, S. H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **90**, 109-119.
- van der Pouw Kraan, T. C., Kasperkovitz, P. V., Verbeet, N., and Verweij, C. L. (2004). Genomics in the immune system. *Clin Immunol* **111**, 175-185.
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* **15**, 1900-1912.
- Waltzer, L., Bataille, L., Peyrefitte, S., and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *Embo J* **21**, 5477-5486.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L., and Haenlin, M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *Embo J* **22**, 6516-6525.
- Weber, A. N., Moncrieffe, M. C., Gangloff, M., Imler, J. L., and Gay, N. J. (2005). Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the *Drosophila* toll pathway. *J Biol Chem* **280**, 22793-22799.
- 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.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13772-13777.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **271**, 13854-13860.

Références supplémentaires

- Godfray, H.C.J. (1994) : Parasitoids Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton Princeton University Press.
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 266-280.

Les cellules sanguines de drosophile, appelées hémocytes, sont de trois types □ i) les plasmacytes sont des phagocytes professionnels, ii) les cellules à cristaux sont impliquées dans les réactions de mélanisation qui participent aux mécanismes de défense, iii) les lamellocytes sont les seuls hémocytes inductibles qui vont se différencier en réponse à des infections parasitaires, ils sont impliqués dans les réactions d'encapsulation des parasites. Au cours de mon travail de thèse, j'ai participé à trois projets étroitement imbriqués: l'un se base sur une analyse du transcriptôme des cellules sanguines de drosophile, les deux autres cherchent à identifier les facteurs nécessaires pour la détermination du lignage lamellocyte suite à une infection parasitaire.

Bien que chaque type hémocytaire, et leurs fonctions respectives, furent décrits il y a plus de 20 ans par Rizki et Rizki, les cellules sanguines de la drosophile ont été peu étudiées. Il y a encore quelques années peu de données moléculaires sur les mécanismes de prolifération et différenciation étaient disponibles, et leur implication réelle dans la réponse immunitaire reste mal connue. Afin d'enrichir nos connaissances génétiques sur l'activité des cellules sanguines de la drosophile, nous avons mené une analyse de l'activité transcriptionnelle des différents types hémocytaires par la technique des puces à ADN Affymetrix. Cette technique permet de «mesurer» individuellement l'activité des 13000 gènes de la drosophile dans les échantillons choisis. Nous avons choisi une stratégie qui permet, par recoupement des données, d'allouer à un type hémocytaire une activité génétique spécifique. Nous avons également analysé les hémocytes de larves soumises à des infections bactériennes, dans le but d'étudier la facette cellulaire de la réponse immunitaire. Cette analyse représente une banque d'informations pour l'étude des fonctions exercées par les cellules sanguines notamment la phagocytose, la mélanisation et l'encapsulation de parasites. Nous avons ainsi mis en évidence certains points importants du processus d'encapsulation. Un rôle signal des hémocytes, primordial pour le déclenchement de la réponse immunitaire, a également été établi. L'établissement du transcriptôme des hémocytes est un outil qui servira de point de référence aux études futures concernant les cellules sanguines.

Lors de mon arrivée au laboratoire, nous ne connaissions aucun des facteurs contrôlant le développement des lamellocytes. Une partie de mon travail de thèse a été consacrée à l'étude du rôle du gène *collier (col)* dans l'hématopoïèse larvaire. *col* code l'unique facteur de transcription de drosophile orthologue de EBF, un facteur impliqué dans la différenciation précoce des lymphocytes B chez les mammifères. Nous avons montré que l'activité du gène *col* est indispensable à la différenciation des lamellocytes et qu'une mutation perte-de-fonction du gène *col* bloque totalement la différenciation des lamellocytes après infection. Nous avons ensuite mis en évidence que le destin lamellocyte peut être forcé dans les prohémoctes en surexprimant Col de façon ciblée dans ces cellules. *col* est exprimé de façon très précoce chez l'embryon dans les cellules qui vont former les primordia de la glande de la lymphe. Plus tard, au cours de la vie larvaire, le gène *col* reste exprimé dans un centre signalisateur de l'hématopoïèse, appelé PSC, récemment identifié. Nous avons proposé un modèle d'action du gène *col* dans l'hématopoïèse de la drosophile, qui se décompose en deux étapes. Nous proposons que le facteur Col confère la compétence aux cellules du PSC à répondre à un signal informatif émis par les plasmacytes suite à l'infection parasitaire. Dans notre modèle, les cellules du PSC émettent alors un second signal (S2), instructif, vers les prohémoctes pour y déclencher le programme de différenciation des lamellocytes.

La suite de mon travail avait pour but d'identifier les différents gènes requis pour la spécification des lamellocytes, et qui s'intègrent dans le modèle proposé. Nous avons identifié un gène, *CG14225*, jusque-là non caractérisé, qui code une protéine transmembranaire putative homologue des récepteurs IL-6R/gp130 des mammifères. Le génome de la drosophile code un deuxième homologue de ces récepteurs, appelé Domeless. Les mutants *domeless* sont létaux embryonnaires et étude de leur implication dans l'hématopoïèse larvaire n'est pas possible pour le moment. *CG14225* est à l'étude et notre analyse en fait un bon candidat pour coder le récepteur de S2. Nous avons généré plusieurs lignées transgéniques, mais leur exploitation n'a pas démontré clairement une implication du gène dans ce processus et il est apparu indispensable d'obtenir un mutant perte-de-fonction. J'ai alors développé deux approches pour générer un mutant nul pour *CG14225*. L'établissement de la lignée mutante est en cours et, à terme, nous permettra de conclure sur l'implication de ce gène dans les processus hématopoïétiques de la drosophile.