

THESE

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

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Domaine : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par

Cécile VIGNAL

Contrôle de l'activation de la voie IMD par les Protéines de Reconnaissance du Peptidoglycane au cours de la réponse immunitaire de *Drosophila melanogaster*

Soutenue publiquement le 14 décembre 2005 devant la commission d'examen :

Dr. Dana PHILPOTT (rapporteur externe)

Institut Pasteur, Paris

Dr. Frédéric BOCCARD (rapporteur externe)

Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette

Pr. Thierry MARTIN (rapporteur interne)

Faculté de Médecine, Strasbourg

Pr. Jules HOFFMANN (examineur)

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

Pr. Julien ROYET (directeur de thèse)

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg

Monsieur Hoffmann, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Ces trois années ont été pour moi l'occasion de travailler dans un environnement de grande qualité scientifique. Je vous remercie également pour votre soutien et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Dana Philpott, Messieurs Frédéric Bocard et Thierry Martin pour avoir accepté de lire et juger ce travail.

Un grand merci à vous Julien. Je suis heureuse d'avoir pu travailler à vos côtés sur ce projet, d'avoir appris à toujours aller de l'avant et à viser plus haut. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir appris à être autonome.

Elisabeth, c'est avec vous que j'ai commencé ma vie scientifique. J'ai passé une année de DEA riche d'enseignements à vos côtés, je vous en remercie.

Vincent, je suis heureuse d'avoir formé cette équipe avec toi. Je te remercie pour tes conseils et pour m'avoir soutenue pendant cette période de rédaction. J'espère que pour toi la suite sera telle que tu la souhaites.

Merci Sebahat pour la grande qualité de ton travail. J'ai eu plaisir à travailler avec toi et j'espère retrouver en post-doc une aide aussi précieuse qu'a été la tienne au cours de ma thèse.

Marie, je te remercie pour tes conseils durant ma thèse et surtout en ces derniers jours de rédaction pour m'avoir aidée dans ma réflexion.

Ma petite Paulounette, merci pour ton aide au quotidien et pour ton réconfort dans les moments de craquage.

Merci à tous les «seniors» du laboratoire pour leurs conseils, Jean-Marc, Jean-Luc, Dominique, Charles, Vincent.

Merci à tous les jeunes, qui contribuent à la bonne ambiance qui règne au laboratoire, et plus particulièrement à Laura, Safia, David, Francine, Delphine...aux anciennes Nadège, Hana, Marie G.

A toutes celles qui ont contribué à mon travail et qui m'ont appris un peu de leur savoir faire. Annie pour les soucis en bio mol, Estelle pour les cellules, Marie-Eve, Laurence, Aurélia, Valérie.

Merci Vanessa, Cat et Jess pour la relecture de ce manuscrit. Merci, Nico pour avoir été mon interprète avec word ces derniers jours☐

Rachel, je te remercie pour ta gentillesse, pour les petites pauses qui font du bien au moral. Merci pour toutes ces vierges que je n'aurais jamais eu le temps de faire.

Nadine, j'ai vraiment apprécié partager ces quelques années avec toi. Ta gentillesse en toutes circonstances restera toujours pour moi une énigme. Ta vision de la vie est belle, surtout ne change pas.

Marie-Céline, merci tout d'abord pour ton aide dans les manips. Je te remercie aussi pour ces moments agréables partagés avec ta petite famille. Merci à toi aussi David, prends bien soin de Marie-Céline et du petit Nathan. J'attends la suite avec impatience.

Merci Jessica pour ces moments moitié labo, moitié perso, je te donne tout mon courage pour la suite.

A mon tiercé VIP, ces moments passés avec vous resteront parmi les meilleurs.

Cécile, à mon tour, je te transmets le relais passé par Cat et JM, à toi de goûter aux joies de la rédaction, soit brillante, on se reverra à ta soutenance.

Catherine, merci de m'avoir fait une place dans le bureau☐ il n'est jamais facile d'arriver en terre inconnue. Je te remercie pour tous les moments que nous avons passé, de m'avoir fait profiter de tes goûts cinématographiques☐

Jean-Michel, je te remercie pour ta gentillesse, ta bonne humeur...tout ce qui a fait que j'ai apprécié ces dernières années passées à Strasbourg.

A toute ma petite famille, je sais que vous avez toujours pensé à moi, vous m'avez porté pendant ces années. A mon grand frère, merci pour ton soutien, même de loin je sais que tu es présent. A ma petite puce, mon psy à moi. Merci pour avoir été là quand j'avais besoin d'écrire ☐ Rendez-vous là haut, on a des p'tits déj à rattraper.

A mon chéri, merci pour ta patience, il en fallait, ça n'a pas été facile tous les jours mais je pense que cette épreuve nous a permis d'avancer. La vie nécessite parfois quelques sacrifices.

A mes parents, papa, maman, sans vous je ne serais jamais arrivée jusque-là. Je ne parviendrais pas en quelques lignes à vous dire combien je vous remercie. Vous avez toujours été présents, pour me soutenir, me remonter le moral, votre amour est inestimable, je vous offre tout le mien en retour.

SOMMAIRE

<i>SOMMAIRE</i>	<i>1</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>4</i>
I. La réponse immunitaire de la drosophile	5
A. Les barrières naturelles	5
B. La réponse cellulaire	6
1. Présentation des cellules sanguines de la drosophile	6
2. Rôle des hémocytes dans la réponse immunitaire	7
a. La phagocytose	7
b. L'encapsulation	8
C. La réponse humorale	8
1. La mélanisation	8
2. La synthèse des peptides antimicrobiens	9
II. Régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens	10
A. La voie Toll et la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif	10
B. La voie IMD et la réponse aux infections par les bactéries à Gram-négatif	12
1. Signalisation par la voie IMD	12
2. La voie de signalisation du récepteur du TNF chez les mammifères	13
3. La voie IMD et l'apoptose chez la drosophile	14
III. Les autres voies de signalisation impliquées dans la réponse aux infections chez la drosophile	15
A. La voie Jun Kinase	15
1. Description	15
2. Participation de la voie JNK à la réponse immunitaire	15
B. La voie JAK/STAT	16
1. Description	16
2. Rôle de la voie JAK/STAT dans l'immunité	16
IV. Les molécules de reconnaissance en amont des voies Toll et IMD mise en évidence des premiers PRRs chez la drosophile	17
A. Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane	18
1. La famille des PGRPs chez la drosophile	18
a. PGRP-SA et la reconnaissance des bactéries à Gram-positif	19
b. Rôle de PGRP-LC et PGRP-LE dans la reconnaissance des infections à Gram-négatif	20
2. Les PGRPs chez les mammifères	21
B. Les Gram-Negative Binding Proteins/β(1,3)-Glucan Recognition Proteins	22
V. La reconnaissance du peptidoglycane dans l'immunité innée	23
A. Structure du peptidoglycane	23
B. Reconnaissance de motifs spécifiques du PGN par le système immunitaire	24
VI. Objectifs de ce travail	27
<i>RESULTATS</i>	<i>28</i>
I. Mode d'action de PGRP-LC en amont de la voie IMD	30
A. Analyse structure fonction de PGRP-LC	30
1. Introduction	30
2. Résultats	31
3. Conclusions	33
B. Les isoformes de PGRP-LC	33
1. Introduction	33
2. Résultats	34
3. Conclusions et discussion	35
II. Rôle des PGRPs à activité amidase	40
A. Introduction	40

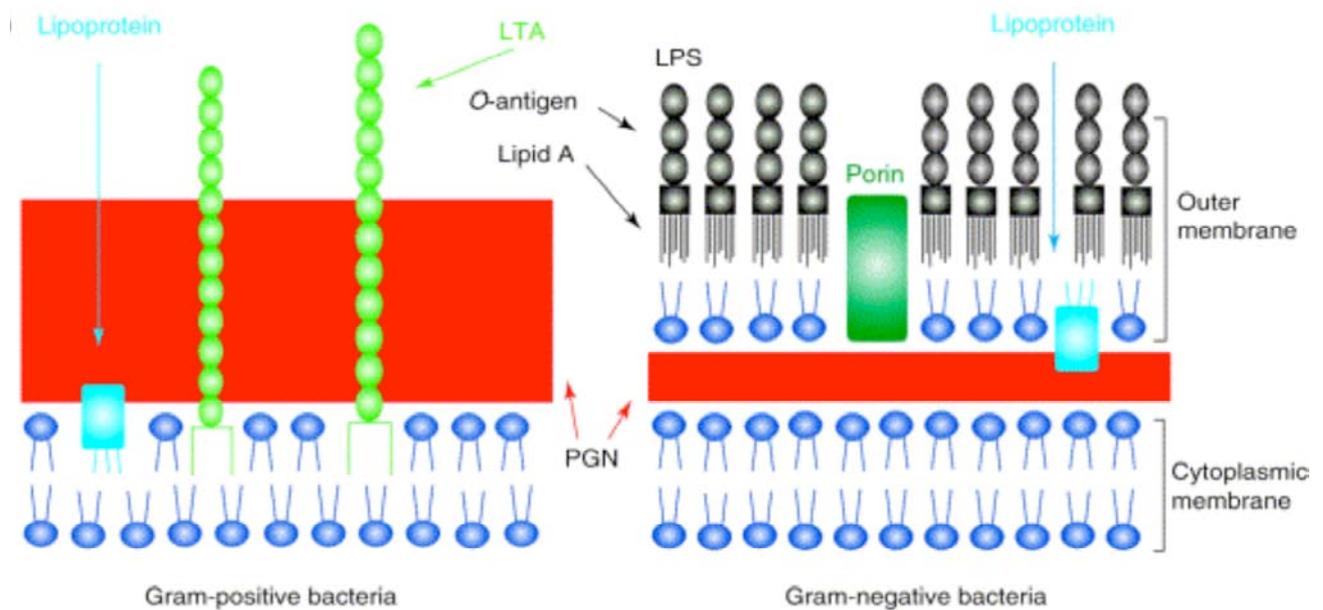
B.	Résultats	41
C.	Expériences complémentaires	43
D.	Conclusions et discussion	44
1.	La reconnaissance du PGN	44
2.	Rôle de l'intestin dans la surveillance immunitaire	45
E.	Perspectives	48
III.	Régulation négative de la voie IMD par PGRP-LF	50
A.	Introduction	50
B.	Résultats	50
1.	PGRP-LF est un régulateur négatif des voies de signalisation IMD et JNK de la drosophile	50
2.	Rôle de PGRP-LF au cours du développement	52
C.	Conclusions	53
D.	Perspectives	53
<i>DISCUSSION</i>		<i>56</i>
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>		<i>60</i>
<i>ANNEXE</i>		<i>73</i>

TABLE DES FIGURES

	page
Figure 1 : Les motifs moléculaires associés aux bactéries	4
Figure 2 Les peptides antimicrobiens de la drosophile	9
Figure 3 La voie de signalisation Toll dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon et dans la réponse immunitaire	11
Figure 4 Voie de signalisation dans la réponse aux infections par les bactéries à Gram-négatif	12
Figure 5 Voie de signalisation du TNF-R1 chez les mammifères	13
Figure 6 Mécanisme de la stimulation de l'apoptose par la voie JNK	15
Figure 7 La famille des PGRPs de la drosophile	18
Figure 8 Les molécules de reconnaissance en amont des voies Toll et IMD	19
Figure 9 Représentation schématique du peptidoglycane des bactéries	23
Figure 10 Etude structure-fonction de PGRP-LC	30
Figure 11 Rôle du domaine transmembranaire dans la signalisation via le récepteur PGRP-LC	31
Figure 12 Effet de la surexpression des différentes constructions de PGRP-LC sur l'activation de la voie IMD et la survie après infection bactérienne	32
Figure 13 Les isoformes de PGRP-LC	33
Figure 14 Effet dominant négatif des isoformes de PGRP-LC	34
Figure 15 Principe de l'interférence à l'ARN <i>in vivo</i> chez la drosophile	35
Figure 16 Effet de l'invalidation des isoformes de PGRP-LC sur l'activation de la voie IMD	35
Figure 17 Survie à <i>E. cloacae</i> et <i>E. carotovora carotovora</i> des drosophiles invalidées pour chacune des isoformes de PGRP-LC	35
Figure 18 Modèle proposé par Chang et coll. pour la reconnaissance du peptidoglycane par PGRP-LCa et -LCx	36
Figure 19 Surexpression de la version mutée de PGRP-SC1	43
Figure 20 La réduction de l'expression des PGRP-SC dans l'intestin augmente l'activation de la voie IMD après infection naturelle	43
Figure 21 Structure de PGRP-LF et arbre phylogénétique de la famille des PGRPs de la drosophile	50
Figure 22 Diminution de PGRP-LF observée par Western blot	50

Figure 23 □ PGRP-LF est un régulateur négatif de la voie IMD	51
Figure 24 □ PGRP-LF est un régulateur négatif de la voie JNK	51
Figure 25 □ PGRP-LF possède une fonction en relation avec l'apoptose	52
Figure 26 □ Rôle de PGRP-LF au cours du développement	52
Figure 27 □ Phénotype d'indentation causé par la diminution de l'expression de PGRP-LF au cours du développement dans le disque imaginal de l'aile	53

INTRODUCTION



D'après Kaisho et Akira 2001

Figure 1 : Les motifs moléculaires associés aux bactéries (PAMPs)

La paroi des bactéries à Gram-positif est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane (PGN) et d'une double couche phospholipidique dans laquelle les acides lipotéichoïques (LTA) et les lipoprotéines sont insérés par leur domaine lipidique.

La paroi des bactéries à Gram-négatif est constituée d'une bicouche lipidique sur laquelle repose une fine couche de PGN. La partie externe de cette paroi est principalement composée par le lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est un complexe macromoléculaire formé par le lipide A et d'une fraction polysaccharidique, l'antigène O exposé à la surface. Dans cette paroi, les porines forment des canaux qui permettent la circulation de molécules de faible poids.

Le LPS, en particulier le lipide A, est extrêmement toxique, il représente l'endotoxine des bactéries à Gram-négatif. Contrairement à la situation chez les mammifères, le LPS ne stimule pas la synthèse des peptides antimicrobiens chez la drosophile.

Outre ces motifs bactériens, l'ADN constitué de motifs CpG hypométhylés des bactéries ou l'ARN double brin des virus sont également des déterminants reconnus par l'hôte infecté.

INTRODUCTION

Tous les êtres vivants sont confrontés dans leur environnement à des agressions diverses telle l'infection par des microorganismes. En conséquence, ils ont développé des mécanismes de protection variés. Au cours de l'évolution, deux systèmes de défense sont apparus. L'immunité innée, commune à toutes les espèces, est la plus ancienne. L'immunité adaptative est apparue plus tardivement et ne concerne que les vertébrés.

Selon la théorie de Janeway, la base de l'immunité innée repose sur la capacité de l'hôte à reconnaître des motifs microbiens variés nommés PAMPs, pour «Pathogen Associated Molecular Patterns», par des récepteurs préexistants de l'hôte, les PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Janeway, 1989). Les PAMPs sont conservés au cours de l'évolution et sont absents chez l'hôte. Ils sont souvent essentiels à la physiologie et à la survie des microorganismes, rendant impossibles les mutations qui permettraient à ces pathogènes d'échapper à la reconnaissance par l'hôte infecté en les faisant varier (Figure 1). Les récepteurs de l'immunité innée (les PRRs) sont codés par des gènes présents dans la lignée germinale, ils auraient été sélectionnés au cours de l'évolution pour leur capacité à reconnaître les motifs moléculaires des agents infectieux.

Chez les vertébrés, la réponse innée active la réponse adaptative. La réponse adaptative fait intervenir les cellules de la lignée lymphoïde, les lymphocytes B et T, qui portent à leur surface des récepteurs générés par réarrangements génétiques. Après reconnaissance de l'antigène, les cellules de l'immunité innée présentent aux lymphocytes l'antigène apprêté. Cette rencontre conduit à l'expansion clonale des lymphocytes qui portent les récepteurs spécifiques de cet antigène. Une autre caractéristique de la réponse adaptative est l'existence d'une mémoire immunitaire qui permet, lors de contacts ultérieurs avec le même antigène, de déclencher une réponse spécifique plus rapide. L'existence d'une mémoire de la réponse innée n'est cependant pas écartée chez les invertébrés (Little et al., 2003).

La synthèse des effecteurs de l'immunité innée est un phénomène rapide qui intervient quelques minutes après la détection de l'antigène. Le développement de l'immunité adaptative quant à lui peut prendre plusieurs jours. L'immunité innée permet alors à l'organisme de se défendre durant la mise en place de l'immunité adaptative, afin d'éviter que les pathogènes ne causent des effets néfastes à l'hôte.

Les invertébrés, comme la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, ne disposent que de la réponse innée pour se défendre contre les infections. Leur succès évolutif démontre l'efficacité de ce mode de défense unique. La conservation des mécanismes de l'immunité innée entre la drosophile et les mammifères, le séquençage de son génome et les nombreux outils génétiques disponibles, font de la drosophile un bon modèle pour l'étude de la défense immunitaire (Adams et al., 2000; Hoffmann et al., 1999).

I. La réponse immunitaire de la drosophile

A. Les barrières naturelles □

La drosophile possède des barrières naturelles qui lui permettent de se protéger des agressions extérieures. Leur cuticule, constituée de chitine et de protéines, forme un squelette externe, ne permettant l'entrée d'agents infectieux que lors d'une lésion. Cette cuticule, sécrétée par l'épiderme sous-jacent, est rendue imperméable par une couche de cire. L'intestin et les trachées sont ainsi des lieux privilégiés pour l'entrée des microorganismes. Ils sont toutefois protégés par une membrane péritrophique qui limite les contacts avec l'extérieur. Un environnement hostile à l'infection microbienne est maintenu dans l'intestin par un pH acide et la synthèse de molécules à activité antimicrobienne telles que le lysozyme (Kylsten et al., 1992). Nous verrons plus loin que ces tissus sont capables de répondre à l'infection.

L'entrée d'agents étrangers dans la cavité interne de la drosophile, l'hémocoèle, active une réponse immunitaire qui repose essentiellement sur deux mécanismes de défense complémentaires. La première composante est cellulaire et fait intervenir les cellules circulantes de la drosophile, les hémocytes, qui jouent un rôle dans la phagocytose et

l'encapsulation. La seconde composante est dite humorale et repose sur les mécanismes de mélanisation et la synthèse de peptides antimicrobiens.

B. La réponse cellulaire

1. Présentation des cellules sanguines de la drosophile

L'hémolymphe de la drosophile contient de nombreux hémocytes, dont les fonctions ressemblent à celles des cellules de la lignée myéloïde des vertébrés. L'hématopoïèse chez la drosophile est un processus biphasique qui va permettre de peupler l'embryon, la larve et l'adulte en cellules matures. Une première population cellulaire apparaît durant le développement embryonnaire et colonise l'embryon. Ces cellules se différencient en plasmacytes, qui sont capables de phagocyter les cellules apoptotiques, et en cellules à cristaux dont le rôle chez l'embryon est encore inconnu (Evans et al., 2003). La seconde vague de l'hématopoïèse débute au premier stade larvaire dans un organe spécialisé, la glande de la lymphe. La glande de la lymphe se forme durant l'embryogenèse, persiste pendant toute la vie larvaire avant de dégénérer lors de l'empupement, libérant les hémocytes qu'elle contient dans la circulation. L'adulte ne possédant pas d'organe hématopoïétique, il semblerait que les hémocytes présents chez la drosophile adulte dérivent des cellules produites lors de ces deux vagues hématopoïétiques (Holz et al., 2003).

Chez la larve, on distingue trois populations hémocytaires différentes□ les plasmacytes constituent la majorité des hémocytes de la larve (90 à 95%), les cellules à cristaux représentent moins de 5% et les lamellocytes, absents chez les larves saines apparaissent en réponse à une infection parasitaire (Meister and Lagueux, 2003). Les plasmacytes sont morphologiquement et fonctionnellement proches des monocytes ou des macrophages des mammifères. Au cours de la métamorphose, ces cellules sont importantes pour l'élimination des cellules apoptotiques générées par l'histolyse et le remodelage des tissus larvaires. Ces cellules phagocytaires jouent également un rôle dans l'élimination des microorganismes. Les cellules à cristaux, qui doivent leur nom aux inclusions cristallines qu'elles contiennent, renferment les enzymes nécessaires à la mélanisation humorale (un mécanisme de défense qui sera décrit plus loin) (Evans et al., 2003). Les lamellocytes sont de

larges cellules plates qui sont produites lorsque les larves sont infectées par des parasites trop gros pour être phagocytés.

Tous les hémocytes de la drosophile dérivent d'un précurseur commun appelé prohémyocyte. Leur différenciation est sous le contrôle de facteurs de transcription conservés au cours de l'évolution. Le facteur de transcription de type GATA *Serpent* est le premier requis pour la spécification des différents types d'hémocytes (Rehorn et al., 1996). Le transactivateur *Gcm* («Glial cells missing») est impliqué dans la détermination des plasmatocytes chez l'embryon (Alfonso and Jones, 2002). La différenciation des cellules à cristaux chez l'embryon et la larve est sous le contrôle du facteur de transcription *Lozenge* (Lebestky et al., 2000). Au stade larvaire, l'expression de *lozenge* est contrôlée par la voie Notch qui joue un rôle instructif dans le développement des cellules à cristaux (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003).

2. Rôle des hémocytes dans la réponse immunitaire

a. La phagocytose

La phagocytose représente une contribution importante des hémocytes à la défense immunitaire. En effet, quelques minutes après l'injection de bactéries dans la drosophile, celles-ci sont phagocytées par les cellules sanguines (Elrod-Erickson et al., 2000). La première étape de la phagocytose repose sur la reconnaissance des particules à phagocyter. Au cours du développement, les cellules apoptotiques sont reconnues par *Croquemort* qui est un homologue du récepteur CD36 des mammifères (Franc et al., 1996)). Le récepteur «Scavenger» *dSR-CI* participe à la détection des bactéries (Ramet et al., 2001). En absence d'infection, on peut remarquer que les larves mutantes *domino* qui sont dépourvues d'hémocytes présentent un nombre élevé de microorganismes dans leur hémolymphe, ce qui suggère qu'en conditions normales, les hémocytes sont responsables de la phagocytose des bactéries endogènes (Braun et al., 1998). Une étude récente a mis en évidence un récepteur de la phagocytose, *Eater*, dont la mutation conduit à une susceptibilité des drosophiles à une infection bactérienne (Kocks et al., 2005). Ce résultat démontre le rôle important joué par les hémocytes dans la défense immunitaire.

Le génome de la drosophile contient six gènes codant pour des TEPs «ThioEster-containing Proteins» (Lagueux et al., 2000). Ces molécules présentent des similarités avec la superfamille des α -2 macroglobulines/facteur C3 du complément des mammifères. Leur expression est régulée positivement par une infection. Leur implication dans l'immunité chez la drosophile n'est pas établie mais un rôle d'opsonine dans la phagocytose ou d'inhibiteur de protéase a été proposé. Des arguments en faveur de la première hypothèse proviennent de travaux effectués chez l'insecte vecteur de la malaria *Anopheles gambiae*, qui ont montré un rôle pour une protéine TEP dans la phagocytose des bactéries à Gram-négatif (Levashina et al., 2001).

b. L'encapsulement

De nombreuses espèces d'hyménoptères peuvent parasiter la drosophile. Ainsi, les femelles de la guêpe *Leptopilina boulardi* pondent leurs œufs dans l'hémocoel des larves. Cet œuf est reconnu par les plasmatocytes circulants, ce qui entraîne la différenciation des lamellocytes. Ces lamellocytes forment alors une couche cellulaire autour de l'œuf qui est ensuite mélanisée probablement grâce à l'enzyme Phénoloxydase qu'ils produisent (cf. chapitre I.C.1. la mélanisation) (Irving et al., 2005; Lanot et al., 2001). Dans cette capsule, le parasite est tué par asphyxie ou par production locale de radicaux libres cytotoxiques et la capsule mélanisée persiste sous forme de corps inerte chez l'adulte (Nappi et al., 1995). Les mécanismes de reconnaissance des parasites ainsi que ceux qui conduisent à l'encapsulement et la mélanisation demeurent encore mal compris (Crozatier et al., 2004).

C. La réponse humorale

1. La mélanisation

Le dépôt de mélanine est un phénomène rapide et très localisé induit par la blessure et la présence d'agents étrangers. L'enzyme clé de la mélanisation est la Phénoloxydase (PO) qui catalyse l'oxydation des phénols en quinones. Celles-ci polymérisent de manière non enzymatique pour former la mélanine (Cerenius and Soderhall, 2004; Soderhall and Cerenius,

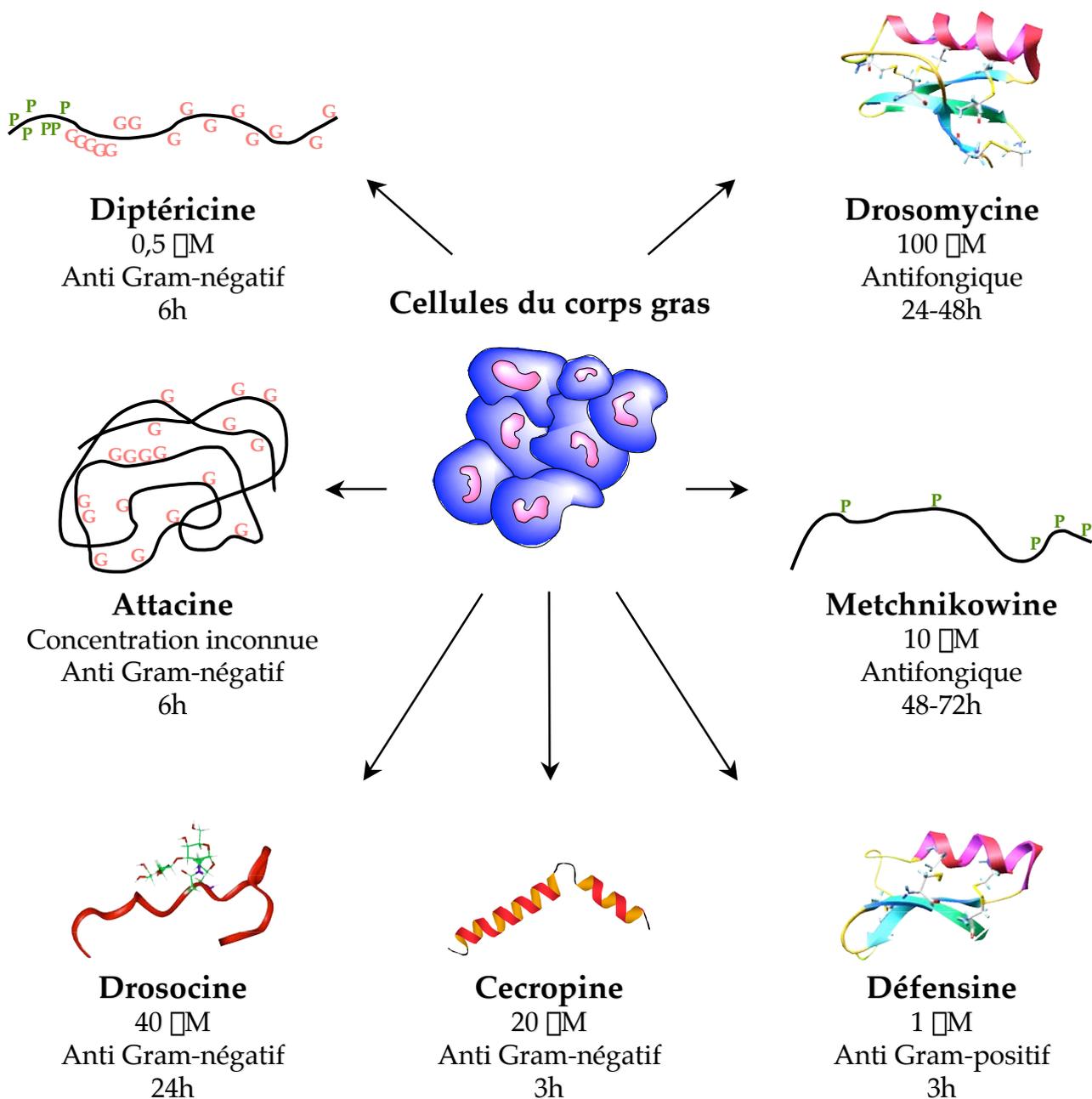


Figure 2 : Les peptides antimicrobiens de la drosophile

Lors d'une infection, les cellules du corps gras synthétisent une batterie de peptides antimicrobiens, qui sont ensuite sécrétés dans l'hémolymphe. Il existe sept familles majeures de peptides antimicrobiens chez la drosophile. La concentration qu'ils peuvent atteindre dans l'hémolymphe, leur activité biologique ainsi que leur pic d'activité transcriptionnelle sont ici indiqués.

1998). La PO est présente dans l'hémolymphe sous la forme inactive de proPO. La coupure protéolytique de la proPO est réalisée suite à l'activation d'une cascade de protéases à sérine appelées «ProPO-Activating Enzyme» (PAE). L'activation de la PO doit être contrôlée pour éviter les effets délétères des intermédiaires toxiques qu'elle génère. Les inhibiteurs de protéases à sérine jouent un rôle important dans cette régulation. Chez la drosophile, la Serpine 27A régule la cascade de la mélanisation en inhibant la PAE terminale (De Gregorio et al., 2002; Ligoxygakis et al., 2002b).

Chez la plupart des insectes, la cascade de mélanisation est activée lors de la détection de l'infection par des molécules de reconnaissance (Soderhall and Cerenius, 1998). Chez la drosophile, la présence de microorganismes conduit à l'activation de la voie Toll (cf. chapitre II. A.) dont une des cibles serait une PAE (Ligoxygakis et al., 2002b). D'autre part, la surexpression d'une protéine de reconnaissance du peptidoglycane PGRP-LE (cf. IV. A. 1. b.) active en l'absence d'infection la mélanisation (Takehana et al., 2002). Cependant, les molécules impliquées ainsi que les mécanismes contrôlant l'activation de la cascade de la PO restent à identifier.

2. La synthèse des peptides antimicrobiens

Une grande partie de la défense humorale repose sur la synthèse de peptides antimicrobiens par l'équivalent fonctionnel du foie des mammifères, le corps gras. Lors d'une infection, ils sont sécrétés dans l'hémolymphe où leur concentration peut atteindre 300 μ M (Meister et al., 2000). Il existe sept familles de peptides antimicrobiens chez la drosophile (Figure 2). Ces familles peuvent être regroupées en trois classes en fonction de leur spectre d'action. On distingue les peptides antifongiques (Drosomycine, Metchnikowine), les molécules dirigées contre les bactéries à Gram-négatif (Attacine, Cécropine, Diptéricine et Drosocine) et les peptides actifs contre les bactéries à Gram-positif (Défensine, Metchnikowine). La plupart de ces peptides agissent en déstabilisant la paroi des bactéries et provoquent leur lyse, mais leur mode d'action n'est pas encore clairement établi.

Tous les epithelia de surface de la drosophile qui sont à l'interface avec l'environnement (intestin, trachées) expriment les peptides antimicrobiens après contact avec des agents infectieux (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000). Ces surfaces d'échange étant des sites privilégiés pour l'infection microbienne, la réponse locale au niveau de ces epithelia peut être un moyen de défense qu'a développé la drosophile pour éviter le déclenchement d'une réponse systémique plus coûteuse en énergie. Chez les mammifères les AMPs jouent également un rôle important dans les défenses épithéliales contre l'infection. (Ganz, 2003).

II. Régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens

L'inductibilité des peptides antimicrobiens de la drosophile après infection et leur profil d'expression différentiel envers le microorganisme rencontré indiquent que la synthèse de ces peptides est régulée. Les premières données sur la régulation de ces peptides proviennent de l'analyse des promoteurs des gènes codant la Cécropine A1 et de la Diptéricine (Engstrom et al., 1993; Kappler et al., 1993). Ces promoteurs possèdent des séquences similaires aux sites de fixation de NF- κ B, un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes de l'immunité chez les mammifères. Le premier homologue de NF- κ B découvert pour son rôle dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale de l'embryon chez la drosophile, est le facteur de transcription Dorsal (Ip et al., 1991). Cependant, la synthèse des peptides antimicrobiens après infection de mouches mutantes *dorsal* est de type sauvage, ce qui suggère que d'autres molécules de type NF- κ B participent à l'induction des peptides antimicrobiens (Lemaitre et al., 1995b).

A. La voie Toll et la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif

Au cours du développement embryonnaire de la drosophile, l'activation du facteur de transcription Dorsal est sous le contrôle de la voie de signalisation Toll (Anderson et al., 1985) (Figure 3). Toll est un récepteur transmembranaire de type I dont le domaine extracellulaire est constitué de séquences riches en leucine et dont le domaine intracytoplasmique présente des similarités avec la queue cytoplasmique des récepteurs de

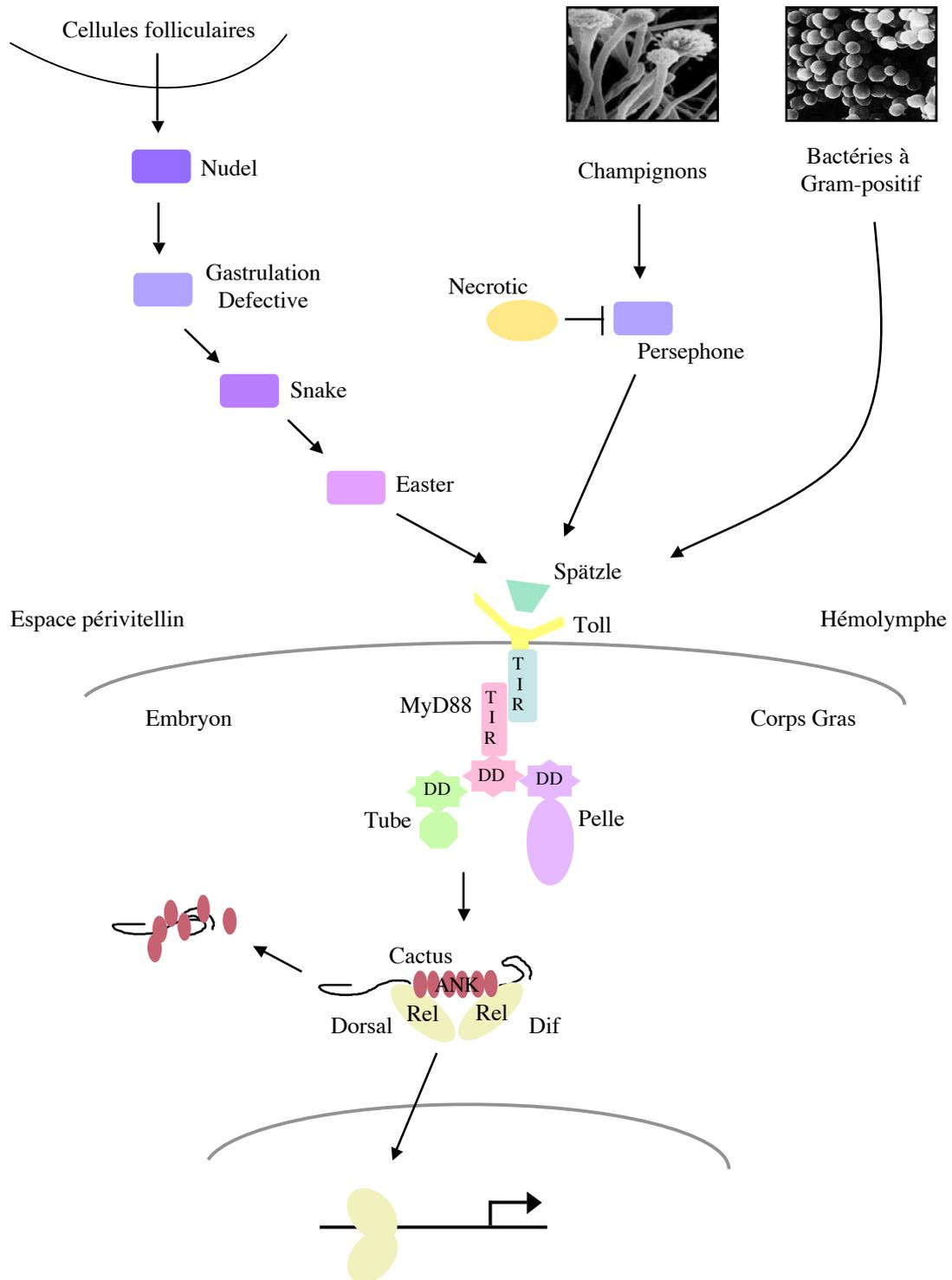


Figure 3 : La voie de signalisation Toll dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon et dans la réponse immunitaire (voir texte)

l'Interleukine 1 (IL-1R). Chez la drosophile, la voie Toll est partiellement réutilisée aux stades larvaires et adulte pour combattre les infections fongiques et bactériennes à Gram-positif. En effet, des drosophiles portant des mutations dans certains membres de la voie Toll (*spätzle*, *Toll*, *tube*, *pelle*) sont incapables de synthétiser les peptides antifongiques et antibactériens à Gram-positif après infection, alors que la synthèse des peptides à activité antibactérienne à Gram-négatif est de type sauvage (Lemaitre et al., 1996). L'homologue de MyD88 des mammifères a également été impliqué dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon et dans la réponse immunitaire. (Kambris et al., 2003; Tauszig-Delamasure et al., 2002). Un complexe MyD88/Tube/Pelle a été mis en évidence en aval du récepteur Toll (Sun et al., 2002). L'activation de ce complexe conduit à la phosphorylation de Cactus, l'homologue de I- κ B des mammifères et à la translocation nucléaire de Dif (Dorsal-related Immune Factor), homologue NF- κ B (Figure 3) (Belvin and Anderson, 1996; Meng et al., 1999). La kinase responsable de la phosphorylation de Cactus n'a pas encore été identifiée, cependant, la voie de l'ubiquitinylation/protéasome est nécessaire pour sa dégradation (Spencer et al., 1999).

Le récepteur Toll est activé par un ligand endogène de type cytokine, Spätzle (SPZ), qui est présent dans l'hémolymphe sous forme non active (pro-Spätzle) (Weber et al., 2003). L'activation de Spätzle au cours de l'ovogenèse fait intervenir une cascade protéolytique qui implique les protéases à sérine Nudel, Gastrulation Defective, Snake et Easter. Les drosophiles mutantes pour ces composants extracellulaires de la voie Toll chez l'embryon présentent une induction de type sauvage de la synthèse des peptides antimicrobiens, ce qui indique que cette cascade protéolytique n'est pas réutilisée au cours de la réponse immunitaire. Lors d'une infection fongique, le clivage de SPZ fait intervenir une autre cascade protéolytique placée sous le contrôle de l'inhibiteur de protéases Necrotic (NEC) et qui fait intervenir la protéase à sérine Persephone (PSH) (Ligoxygakis et al., 2002a; Ligoxygakis et al., 2002b).

Le génome de la drosophile contient neuf gènes de la famille Toll (Tauszig et al., 2000). Chez les mammifères, les Toll-like receptors (découverts grâce à la mise en évidence du rôle de Toll dans la réponse immunitaire de la drosophile) sont activés par des ligands microbiens divers (Takeda et al., 2003). Ceci suggérerait que les autres récepteurs Toll de la drosophile

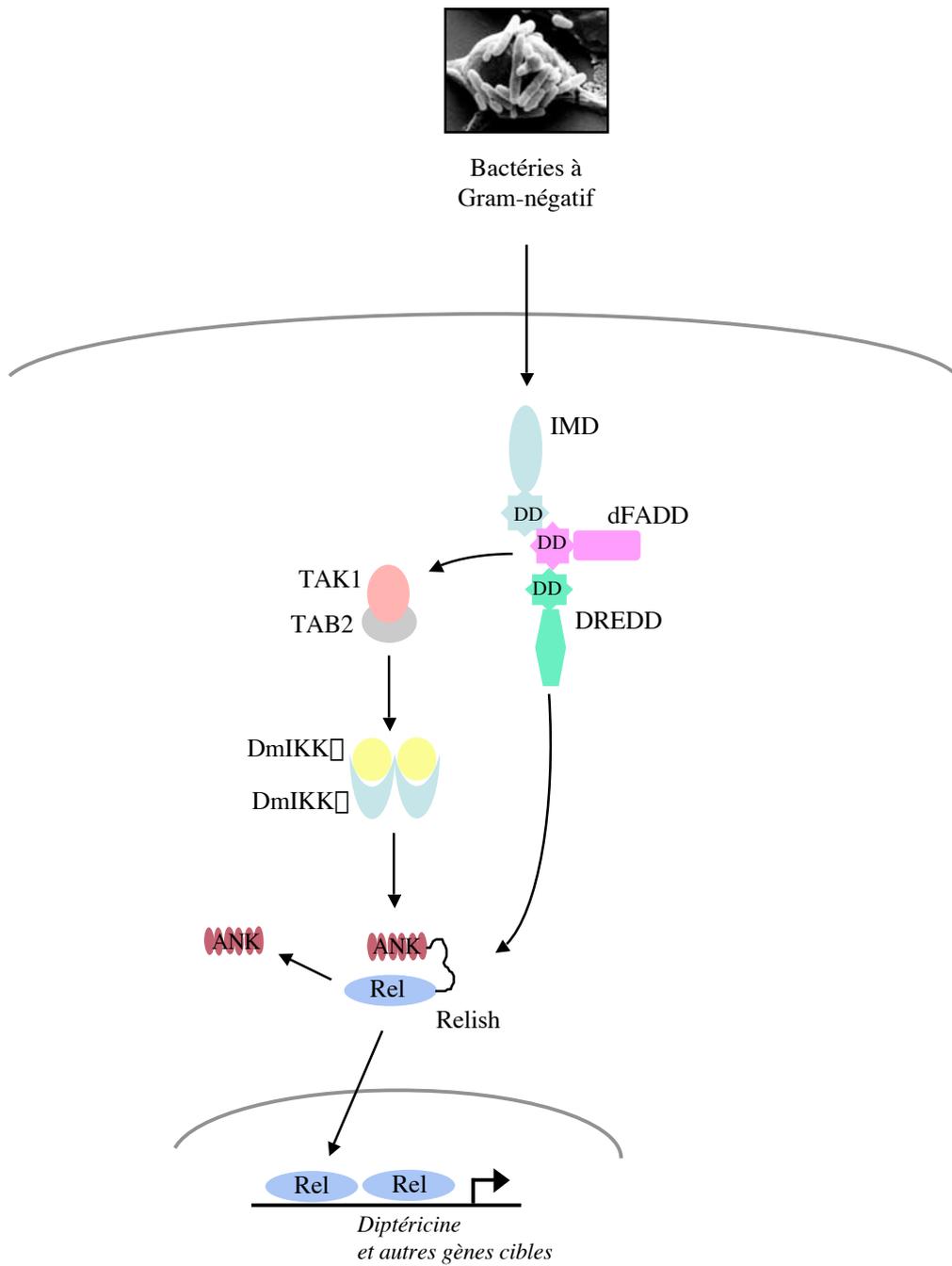


Figure 4 : Voie de signalisation IMD dans la réponse aux infections par les bactéries à Gram-négatif (voir texte)

pouvaient avoir une fonction immunitaire. Cependant jusqu'à présent, seul le récepteur Toll lui-même a été clairement impliqué dans l'immunité. Le profil d'expression des autres récepteurs Toll au cours de l'embryogenèse indique que ces molécules pourraient posséder des fonctions développementales (Kambris et al., 2002).

B. La voie IMD et la réponse aux infections par les bactéries à Gram-négatif

1. Signalisation par la voie IMD

Parallèlement à la mise en évidence du rôle du récepteur Toll dans la réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif, la mutation «*Immune deficiency*» (*imd*) a été isolée (Figure 4) (Lemaitre et al., 1995a). Cette mutation réduit l'inductibilité des AMPs à activité dirigée contre les bactéries à Gram-négatif, mais n'a aucun effet sur la synthèse des autres peptides. IMD est une protéine à «death domain» similaire à la molécule «Receptor Interacting Protein 1» (RIP1) de la voie du TNF des mammifères (Georgel et al., 2001). Un crible en double-hybride a montré qu'IMD se lie à l'homologue de la molécule FADD des mammifères (dFADD) qui interagit ensuite avec DREDD (homologue de la caspase 8) par l'intermédiaire de leurs «death domain» (Naitza et al., 2002). Cette interaction intervient dans l'activation protéolytique de DREDD (Elrod-Erickson et al., 2000; Hu and Yang, 2000; Leulier et al., 2000; Leulier et al., 2002). IMD, dFADD et DREDD formeraient un complexe qui participerait à l'activation de la kinase «Transforming growth factor-Activated Kinase 1» (TAK1) dont l'homologue participe également à la transduction du signal dans la voie du TNF chez les mammifères (Zhou et al., 2005) (Gobert V et Ferrandon D, communication personnelle) (Kleino et al., 2005). Un complexe formé de TAK1 et de la protéine adaptatrice «TAK1-Binding Protein 2» (TAB2) est requis pour l'activation du complexe «I κ B Kinase» (IKK) formé de deux sous-unités régulatrices IKK β et deux sous-unités catalytiques IKK α (Lu et al., 2001; Rutschmann et al., 2000). La cible de la voie IMD est le facteur de transcription Relish dont la structure est similaire aux protéines p100 et p105 des mammifères (précurseurs des sous-unités p52 et p50 du facteur de transcription NF- κ B). Relish possède un domaine d'homologie Rel en position N-terminale et un domaine de répétitions ankyrine ressemblant à l'inhibiteur I- κ B du côté carboxyterminal (Dushay et al., 1996). En absence d'infection, Relish est retenu dans le cytoplasme par son propre domaine inhibiteur. La phosphorylation de Relish par le complexe IKK est requise préalablement à son clivage. La

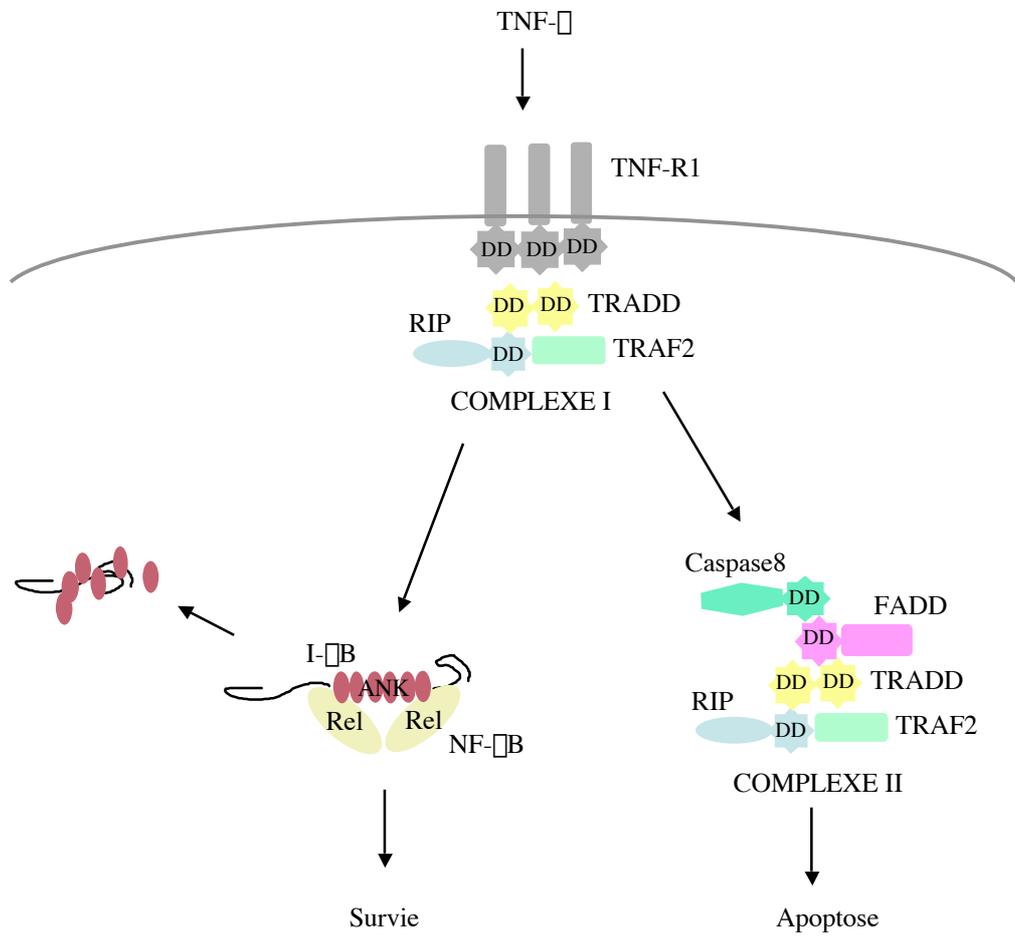


Figure 5 : Voie de signalisation du TNF-R1 chez les mammifères (voir texte)

partie N-terminale, qui contient les séquences de liaison à l'ADN, entre dans le noyau pour activer ses gènes cibles, tels ceux codant les peptides dirigés contre les bactéries à Gram-négatif. Sa partie C-terminale reste dans le cytoplasme (Stoven et al., 2000). DREDD semble jouer à ce niveau un second rôle. En effet, une analyse du site de clivage de Relish suggère l'intervention d'une caspase (Stoven et al., 2003). Cependant, bien qu'il ait été établi que DREDD et Relish interagissent, la coupure de Relish par DREDD n'a pas encore été directement démontrée. Les drosophiles mutantes pour les différents composants de la voie IMD succombent à l'infection par des bactéries à Gram-négatif et présentent une diminution de la synthèse des peptides antimicrobiens dont l'activité est dirigée contre ces bactéries.

Nous pouvons noter ici que l'expression des peptides antimicrobiens au niveau des epithelia est régulée par la voie IMD. Ainsi, la *Drosomycine*, dont l'expression est régulée par la voie Toll lors de la réponse systémique, est régulée par la voie IMD dans le tractus respiratoire. Ceci démontre l'existence de mécanismes de régulation différents pour l'induction des peptides antimicrobiens en fonction du tissu concerné (Onfelt Tingvall et al., 2001; Tzou et al., 2000).

2. La voie de signalisation du récepteur du TNF chez les mammifères

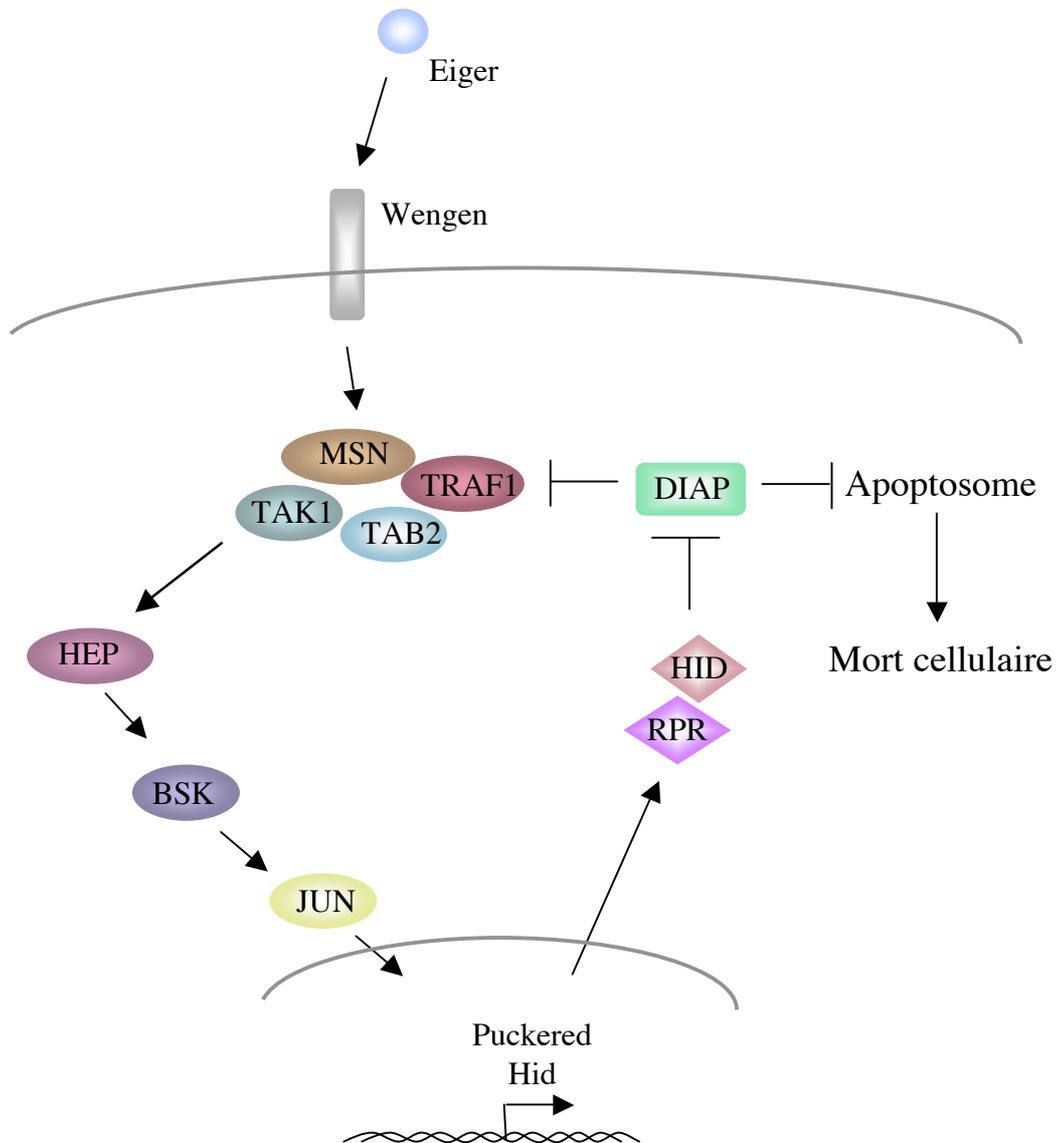
La signalisation intracytoplasmique de la voie IMD présente de nombreuses similitudes avec la voie du récepteur du TNF des mammifères (Figure 5). La voie du TNF est impliquée dans divers processus biologiques, tels que la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. L'étude des mécanismes moléculaires résultants de l'activation du récepteur du TNF ont montré que le recrutement séquentiel de deux complexes différents en aval du récepteur est à l'origine de ses diverses fonctions (Micheau and Tschopp, 2003; Muppidi et al., 2004). Ainsi, l'activation du récepteur du TNF par liaison de son ligand conduit à la formation d'un premier complexe, par le recrutement de RIP1, TRADD, TRAF2 et à l'activation du facteur de transcription NF- κ B favorisant la survie cellulaire. Alternativement, un second complexe peut se former par recrutement de FADD et de la caspase 8 qui conduirait la cellule vers la voie de l'apoptose.

Deux homologues de la super-famille du TNF ont été identifiés et impliqués dans les processus d'apoptose chez la drosophile, le ligand Eiger et son récepteur Wengen (Igaki et al., 2002; Kauppila et al., 2003; Moreno et al., 2002). Cependant, de manière surprenante, ces protéines n'interviennent pas dans la voie IMD, mais semblent induire l'apoptose *via* la voie de signalisation Jun Kinase qui sera décrite plus loin.

3. La voie IMD et l'apoptose chez la drosophile

De nombreuses observations indiquent que la voie IMD participerait au déclenchement de l'apoptose chez la drosophile. En effet, la surexpression ubiquitaire de *imd* est létale pour les larves de drosophile (Georgel et al., 2001). Cette létalité est sauvée par la co-expression de l'inhibiteur de caspase p35, ce qui suggère qu'elle découle d'un processus apoptotique caspase-dépendant. La surexpression d'*imd* dans le corps gras induit également la transcription du gène *reaper*, un activateur de l'apoptose. La létalité induite par la surexpression d'*imd* est supprimée dans les mutants *dredd* ou *fadd*. En revanche, une mutation touchant *Tak1* ne réduit que légèrement la létalité. Ces résultats indiquent que la létalité est médiée par la branche FADD/DREDD de la voie IMD et que la branche TAK1 ne semble pas requise dans ce processus (Leulier et al., 2002).

Le rôle de la voie IMD dans les mécanismes de l'apoptose chez la drosophile reste encore mal compris et nécessite des études supplémentaires.



D'après Stronach et al., 2005

Figure 6 : Mécanisme de la stimulation de l'apoptose par la voie JNK

L'activation de la voie JNK stimule l'expression des gènes proapoptotiques *hid* et *rpr* qui inhibent DIAP (Drosophila Inhibitor of Apoptosis) permettant la stabilisation et l'activation des protéines de l'apoptosome. L'inhibition de DIAP stabilise également TRAF1 qui conduit à l'activation de la voie JNK.

III. Les autres voies de signalisation impliquées dans la réponse aux infections chez la drosophile

A. La voie Jun Kinase

1. Description

Outre son rôle dans la voie IMD, TAK1 participe à l'activation de la voie c-Jun amino-terminal Kinase (JNK) (Silverman et al., 2003). La voie JNK est impliquée dans de nombreux processus chez la drosophile, incluant la morphogénèse, la cicatrisation, l'apoptose, la réponse au stress ou la réponse immunitaire (Sluss et al., 1996; Stronach, 2005). Lors de l'apoptose, la voie JNK est activée par la fixation de Eiger sur le récepteur putatif de la voie, Wengen (Moreno et al., 2002) (Figure 6). Par la suite, un complexe entre Msn, dTRAF1 (homologue de hTRAF2), TAB2 et TAK1 se forme pour faciliter la phosphorylation et l'activation de TAK1 par la kinase Misshapen (MSN) (Igaki et al., 2002; Kauppila et al., 2003; Liu et al., 1999). TAK1 active alors la JNKK Hemipterous (HEP) et la JNK Basket (BSK), ce qui résulte en la phosphorylation de «Jun-Related Antigen» (JRA) (Geuking et al., 2005). JRA et l'homologue de Fos, Kayak (KAY), dimérisent pour former le facteur de transcription AP-1 de la voie JNK (Kockel et al., 2001).

2. Participation de la voie JNK à la réponse immunitaire

La stimulation de la réponse immunitaire de la drosophile par une infection bactérienne conduit à l'activation des voies NF- κ B, Toll et IMD, mais également à l'activation de la voie JNK (Boutros et al., 2002). Cependant, la voie JNK n'est activée que de manière transitoire et revient à un niveau basal une heure après infection (Sluss et al., 1996). Cette voie ne semble pas nécessaire à la régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens, mais elle joue plutôt un rôle dans l'expression d'autres gènes qui ont une fonction dans la cicatrisation et la réponse au stress (Galko and Krasnow, 2004; Silverman et al., 2003).

La fonction la mieux documentée de la voie JNK chez la drosophile est celle responsable de la fermeture dorsale de l'embryon au cours du développement (Noselli and

Agnes, 1999). Ce mécanisme de fermeture est similaire à celui de la cicatrisation lors d'une blessure qui fait également intervenir la voie JNK (Ramet et al., 2002a). Ces deux processus impliquent des mouvements cellulaires au dessus de la brèche pour permettre sa fermeture (Galko and Krasnow, 2004). Il est intéressant de noter que la voie JNK conduit alors à la transcription de nombreux constituants du cytosquelette (Boutros et al., 2002).

B. La voie JAK/STAT

1. Description

La voie «Janus-Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription» (JAK/STAT) a été mise en évidence chez la drosophile au cours d'études sur le développement embryonnaire (Binari and Perrimon, 1994). Cette voie est activée par la fixation de la molécule de type cytokine Unpaired (UPD) sur le récepteur Domeless (DOME) qui résulte en la dimérisation et l'activation de la kinase Hopscotch (Hop). La phosphorylation de DOME entraîne le recrutement et l'activation du facteur de transcription STAT qui entre dans le noyau sous forme de dimère pour activer la transcription de ses gènes cibles (Agaisse et al., 2003).

2. Rôle de la voie JAK/STAT dans l'immunité

Agaisse et coll. ont montré que, suite à une infection microbienne, le facteur de transcription STAT pénètre dans le noyau et que cette activation est dépendante de la kinase HOP (Agaisse et al., 2003). Ce résultat indique que la voie JAK/STAT joue un rôle dans la réponse immunitaire. Parmi les gènes régulés par la voie JAK/STAT, on retrouve *tepl* ainsi que le gène de stress *turandot A (totA)* (Ekengren et al., 2001; Lagueux et al., 2000). La cytokine UPD3 est produite par les hémocytes après une infection et active la transcription de *totA* dans le corps gras *via* le récepteur DOME et la voie JAK-STAT. Cette observation indique qu'il existe une communication entre les cellules circulantes et le corps gras lors de la réponse à l'infection. La voie JAK/STAT est également impliquée dans l'hématopoïèse. En effet, une différenciation constitutive de lamellocytes est observée dans des larves qui présentent une mutation gain-de-fonction pour la kinase HOP (Hanratty and Dearolf, 1993).

De plus, les larves mutantes pour cette kinase ne sont plus capables de produire des lamellocytes lors d'une infection parasitaire. Enfin, il a été récemment démontré que la voie JAK/STAT est nécessaire pour le déclenchement la réponse antivirale de la drosophile (Dostert et al., 2005).

IV. Les molécules de reconnaissance en amont des voies Toll et IMD □ mise en évidence des premiers PRRs chez la drosophile □

Bien que de nombreuses similarités existent au niveau de la signalisation intracytoplasmique entre la voie des TLRs/IL-1R des mammifères et la voie Toll de la drosophile, des différences importantes subsistent, par exemple au niveau du mode d'activation de ces récepteurs par les microorganismes. En effet, chez les mammifères, les TLRs participent à la reconnaissance directe des motifs microbiens alors que chez la drosophile, le récepteur Toll est activé par liaison d'une molécule de type cytokine.

La drosophile est capable de monter une réponse adaptée au type de microorganisme rencontré. Ainsi, la voie Toll est activée en réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif et conduit à la transcription de nombreux gènes dont ceux codant les peptides antifongiques. La voie IMD est déclenchée par les bactéries à Gram-négatif, elle induit l'expression spécifique des gènes codant les AMPs à activité dirigée contre ces bactéries ainsi que de nombreux autres gènes. Ces observations suggèrent que la drosophile est capable de discriminer entre les différents pathogènes qui l'infectent. En effet, pour détecter une infection, la drosophile possède différents récepteurs qui sont capables de se lier à des motifs microbiens spécifiques pour déclencher une réponse appropriée. Différentes études ont montré que des membres de la famille des protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRPs, PeptidoGlycan Recognition Proteins) et des GGBP/□-GRP (Gram-Negative Binding Proteins/□(1,3)-Glucan Recognition Proteins) sont responsables de la détection des microorganismes.

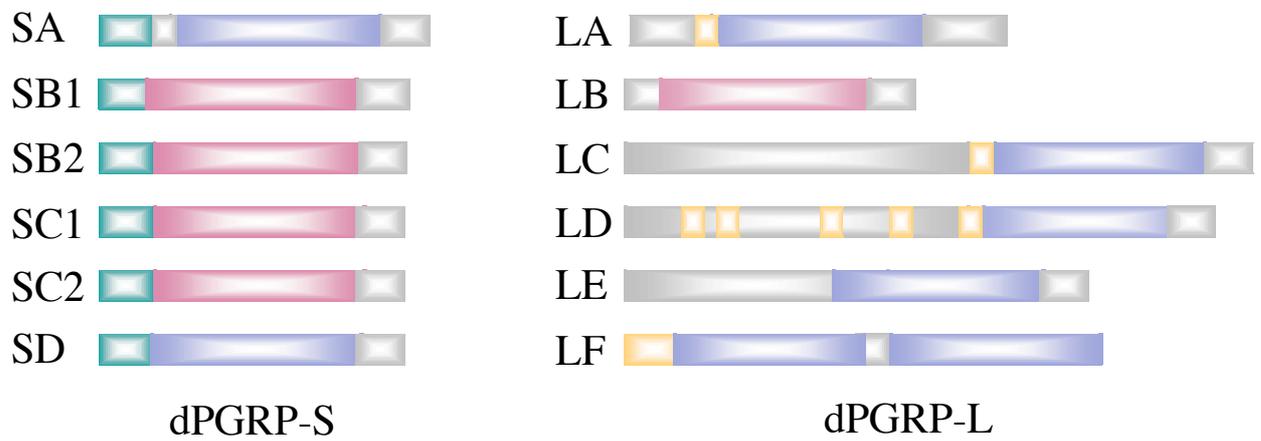


Figure 7 : La famille des PGRPs de la drosophile (voir texte)

A. Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane

Les PGRPs ont pour la première fois été mis en évidence puis caractérisés dans l'hémolymphe du ver à soie (*Bombyx mori*) pour leur capacité à lier le PGN (mais pas la chitine ou le α (1,3)-glucane) (Ochiai and Ashida, 1999; Yoshida et al., 1996; Yoshida et al., 1986). Chez cet insecte, cette protéine circulante de 19kDa active la PO en réponse à l'injection de PGN. Une recherche d'homologies a montré que les PGRPs sont des molécules conservées au cours de l'évolution, de l'insecte à l'homme (Kang et al., 1998).

1. La famille des PGRPs chez la drosophile

Le génome de la drosophile contient 13 gènes codant pour des PGRPs. Les PGRPs peuvent être classés en deux sous-familles (Werner et al., 2000) (figure 7). Les PGRPs courts (PGRP-S) et les PGRPs longs (PGRP-L), nommés ainsi pour la taille de leur transcrite et de leur partie 5' non traduite. Tous les PGRPs ont en commun un domaine PGRP d'environ 160 acides aminés. Le domaine PGRP unique des formes courtes est précédé d'un peptide signal, ce qui suggère que ces protéines sont secrétées dans l'hémolymphe. La sous-famille des PGRPs longs est plus hétérogène et la plupart des gènes conduisent à l'expression de plusieurs isoformes. Les membres de la famille des PGRPs longs codent des protéines qui peuvent contenir plusieurs domaines PGRPs (comme par exemple PGRP-LF). D'autre part, ces protéines ont une localisation cellulaire plus complexe. En effet, si certaines possèdent un ou plusieurs domaines transmembranaires (PGRP-LD, LC, LA et LF), les protéines LB et LE ne possèdent pas de domaine transmembranaire ni de peptide signal prédits.

Les PGRPs possèdent des homologies de séquence avec le lysozyme des bactériophages T7 ou T3 qui est une enzyme capable d'hydrolyser le PGN entre l'acide *N*-acétylmuramique du glycane et le premier acide aminé du pont peptidique (figure 8) (Kang et al., 1998). Cette homologie indique que les PGRPs font partie de la famille des amidases *N*-acétylmuramoyl-L-alanine. La résolution de la structure cristalline du lysozyme du bactériophage T7 a mis en évidence certains acides aminés essentiels à son activité enzymatique (Cheng et al., 1994). Par comparaison de séquences, il s'est avéré que six membres de la famille des PGRPs de la

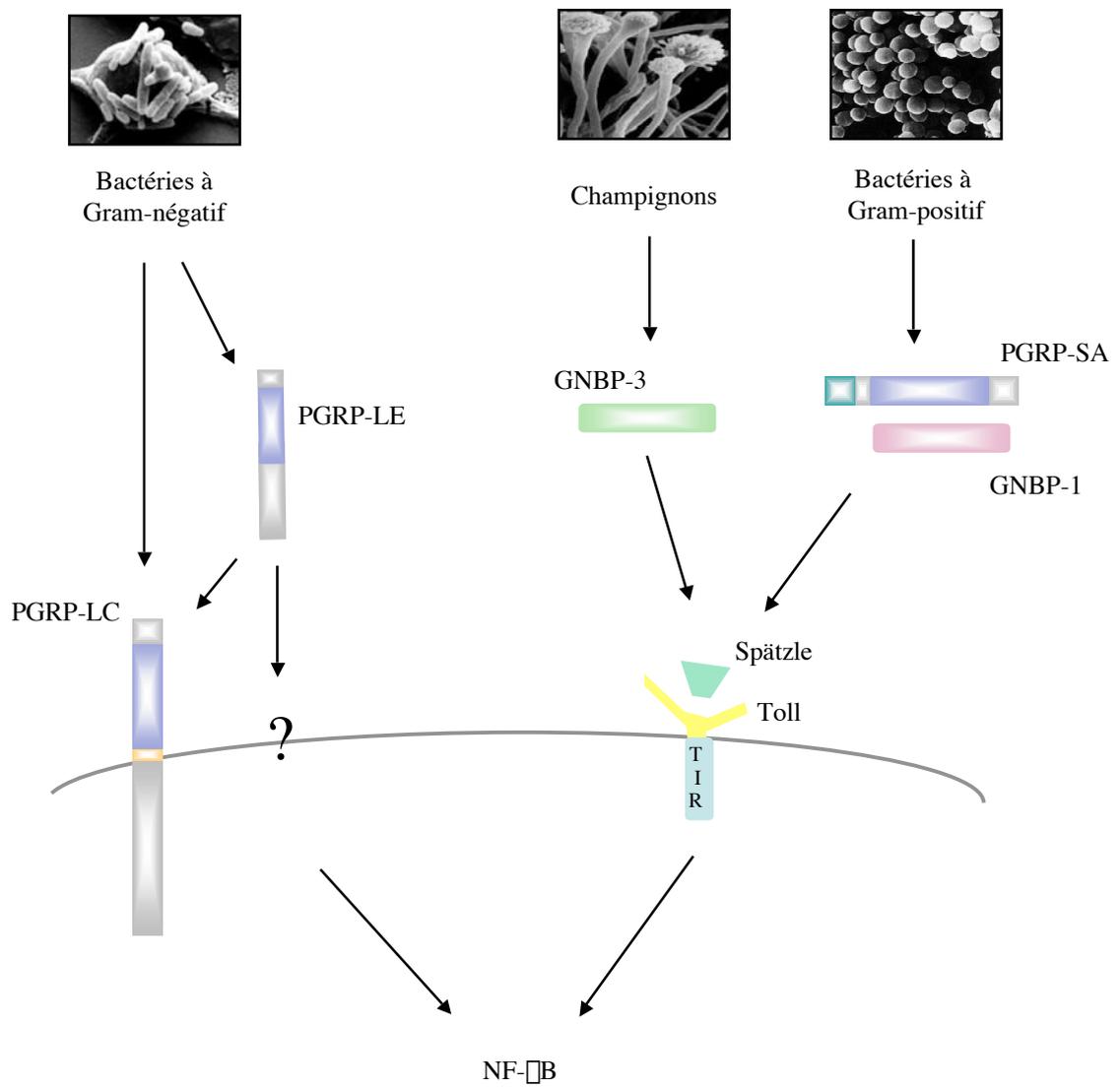


Figure 8 : Les molécules de reconnaissance en amont des voies Toll et IMD (voir texte)

drosophile ont conservé ces résidus, ce qui leur attribue une activité amidase potentielle (voir figure 7) (Mellroth et al., 2003).

La capacité des PGRPs du ver à soie à activer la PO, leur patron d'expression dans des organes immunocompétents tels que le corps gras, l'intestin ou les hémocytes et leur inductibilité par injection de PGN suggèrent un rôle de ces molécules de reconnaissance dans la réponse immunitaire (Werner et al., 2000; Yoshida et al., 1996). Différents cribles ont effectivement permis de démontrer le rôle de certains PGRPs dans la réponse immunitaire de la drosophile.

a. PGRP-SA et la reconnaissance des bactéries à Gram-positif

Une mutagenèse à l'Ethyl Methane Sulfonate (EMS) a permis d'isoler, dans notre laboratoire, la première mutation affectant un PGRP requis dans la réponse immunitaire (Michel et al., 2001). Cette mutation ponctuelle nommée *semmelweis* (*seml*), est située dans le domaine PGRP et transforme une cystéine en tyrosine. Cette cystéine (en position 80) est conservée dans 90% des PGRPs et se trouve proche d'un autre résidu cystéine, suggérant son implication dans un pont di-sulfure. La mutation *seml* entraînerait une perturbation importante de la structure tridimensionnelle de PGRP-SA, et par conséquent, de son activité (Chang et al., 2004; Reiser et al., 2004). L'expression de la *Diptéricine* après infection par des bactéries à Gram-négatif n'est pas modifiée dans les drosophiles mutantes *seml* en comparaison à des drosophiles sauvages. En revanche, lorsque les mouches *seml* sont infectées par des bactéries à Gram-positif (*Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus thuringiensis*) la synthèse de *Drosomycine* est abolie et ces mouches sont fortement susceptibles à ce type d'infection. Une autre observation importante faite lors de l'étude du phénotype des mouches *seml* est leur résistance de type sauvage à une infection par des champignons et leur capacité à produire la *Drosomycine* lors de cette infection. Des études d'épistasie ont montré que PGRP-SA est nécessaire en amont de la voie Toll pour la coupure protéolytique de SPZ (Figure 8). Cette étude a ainsi mis en évidence la première molécule capable de discriminer entre une infection fongique et une infection bactérienne à Gram-positif. Cependant, les mécanismes conduisant à l'activation de SPZ suite à la reconnaissance des bactéries à Gram-positif par PGRP-SA restent à déterminer.

b. Rôle de PGRP-LC et PGRP-LE dans la reconnaissance des infections à Gram-négatif

Le rôle important des PGRPs dans le déclenchement des voies de signalisation de l'immunité chez la drosophile a également été documenté par le phénotype associé à une mutation perte-de-fonction de PGRP-LC. De manière indépendante, trois laboratoires ont obtenu des lignées mutantes pour PGRP-LC lors d'un crible à l'EMS dans l'équipe de K. Anderson (mutant nommé *ird7*), par mobilisation d'un élément transposable dans le groupe d'A. Ezekowitz (mutant *totem*) et dans notre laboratoire (*PGRP-LC^{E12}*) (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002b).

Les drosophiles mutantes pour PGRP-LC ne sont plus capables de produire les peptides antimicrobiens spécifiques de la voie IMD (Diptéricine, Attacine et Cécropine) après infection par des bactéries à Gram-négatif et sont sensibles à ces infections (Gottar et al., 2002). De plus, le clivage de Relish n'est plus observé dans les mutants *ird7*, indiquant que PGRP-LC est nécessaire à l'activation de ce facteur de transcription (Choe et al., 2002). En revanche, la réponse des mutants PGRP-LC aux infections par des bactéries à Gram-positif et des champignons est de type sauvage. L'étude d'épistasie a montré que PGRP-LC agit en amont d'IMD (Figure 8). Cependant, le phénotype des mutants *PGRP-LC* (induction des peptides et survie) n'est pas aussi sévère que celui observé avec un mutant affectant un composé intracytoplasmique de la voie IMD comme *Key* (mutant de la sous-unité IKK du signalosome), ce qui suggère que PGRP-LC n'est pas le seul récepteur en amont d'IMD.

En 2002, une première étude a montré que la surexpression d'une autre molécule de la famille des PGRPs, PGRP-LE, est capable d'activer de manière constitutive la voie IMD en amont de IMD et Relish (Takehana et al., 2002). Une étude complémentaire avec un mutant perte-de-fonction a ensuite été réalisée par la même équipe, indiquant que PGRP-LE agit en synergie avec PGRP-LC pour assurer la résistance des drosophiles à une infection par *Escherichia coli* et *Bacillus megaterium* (Takehana et al., 2004). Cependant, dans un mutant *PGRP-LC*, l'expression constitutive de la *Diptéricine* suite à la surexpression de PGRP-LE n'est que faiblement réduite. Ces résultats indiquent que PGRP-LE, qui est présente dans

l'hémolymphe, active la voie IMD par l'intermédiaire d'un autre récepteur transmembranaire (Figure 8).

2. Les PGRPs chez les mammifères

Quatre PGRPs ont été identifiés dans le génome de la souris et de l'homme : un PGRP-S, un PGRP-L et deux PGRPs intermédiaires PGRP-I α et PGRP-I β (forme absente chez la drosophile) (Kang et al., 1998; Liu et al., 2001). La présence de ces homologues chez l'homme soulève d'intéressantes questions sur le rôle de ces protéines dans la réponse immunitaire des mammifères. Les PGRPs présents chez les mammifères sont capables de se lier au peptidoglycane et à certaines bactéries avec des affinités diverses (Liu et al., 2001). Le PGRP-S de souris (M.m-PGRP-S) est exprimé dans les granules des neutrophiles. M.m-PGRP-S ne coupe pas le PGN et n'est pas bactériolytique mais il inhibe la croissance des bactéries à Gram-positif *in vitro* (Liu et al., 2000). Des souris déficientes pour PGRP-S ne sont plus capables d'éliminer les bactéries présentes dans les neutrophiles (Dziarski et al., 2003). Cependant, cette activité antimicrobienne de PGRP-S est réduite aux bactéries faiblement pathogènes. L'élimination des bactéries ne repose pas sur l'effet unique des peptides antimicrobiens (Hampton et al., 1998). L'élimination des bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* nécessite aussi les mécanismes dépendants de l'oxygène alors que les bactéries non pathogènes, telles qu'*E. coli*, peuvent être éliminées de manière indépendante de ces mécanismes. Cette différence, ainsi que la faible affinité de PGRP-S pour *S. aureus*, permet d'expliquer pourquoi la déficience en PGRP-S n'a pas d'effet lors de la défense contre les bactéries les plus pathogènes. Cette différence est également en accord avec la notion que les bactéries faiblement pathogènes sont plus facilement éliminées que les bactéries pathogènes, qui ont évolué pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. PGRP-L humain est exprimé dans le foie. Les études menées avec des souris déficientes pour PGRP-L indiquent que cette molécule n'est pas indispensable pour la défense immunitaire (Xu et al., 2004). Les PGRPs humains I α et I β sont des protéines transmembranaires qui possèdent un domaine intracytoplasmique court et deux domaines PGRPs extracellulaires. Ces PGRPs sont exprimés dans l'œsophage (Liu et al., 2001). Bien que peu d'études existent sur l'immunité au niveau de l'œsophage, cet organe directement en contact avec les microorganismes doit posséder une activité antimicrobienne importante. Les PGRPs I α et I β

pourraient participer à la reconnaissance des bactéries dans l'œsophage et jouer un rôle dans la défense anti-microbienne.

En résumé, contrairement à ce qui a été démontré chez la drosophile, les PGRPs de mammifères ne semblent pas activer les voies de signalisation intracellulaire mais s'avèrent plutôt jouer un rôle antibactérien ou de molécule scavenger.

B. Les Gram-Negative Binding Proteins/ β (1,3)-Glucan Recognition Proteins

Les GNBP1 et les β -GRPs ont d'abord été mises en évidence chez *B. mori* pour leur capacité à se fixer aux bactéries à Gram-négatif et au β (1,3)-Glucane, respectivement (Lee et al., 1996) (Yoshida et al., 1986). Le génome de la drosophile contient trois gènes codant des GNBP1, GNBP2 et GNBP3. Les GNBP1 sont composées d'un domaine C-terminal homologue aux β (1,3)-Glucanases des bactéries, cependant la perte de résidus essentiels à l'activité enzymatique suggère que les GNBP1 ont perdu l'activité glucanase. La partie N-terminale est quant à elle caractérisée par un domaine de liaison au β (1,3)-Glucane.

Une première étude réalisée *in vitro* sur GNBP1 a montré que cette protéine se fixe au LPS des bactéries à Gram-négatif et au β (1,3)-Glucane des levures, et qu'elle intervient dans la synthèse des peptides antimicrobiens (Cécropine, Attacine et Drosomycine) (Kim et al., 2000). L'équipe de Dominique Ferrandon au sein de notre laboratoire a étudié *in vivo* le phénotype des drosophiles mutantes pour *GNBP1* (*GNBP1^{osiris}*) (Gobert et al., 2003). Leurs résultats indiquent que GNBP1 est impliqué dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif en amont de la voie Toll (Figure 8). Les mutants GNBP1 présentent un phénotype identique aux mutants *PGRP-SA^{semi}*. Ces protéines collaborent pour reconnaître le peptidoglycane des bactéries à Gram-positif et activent une cascade protéolytique qui conduit à la coupure de SPZ.

Parmi les membres de la famille des GNBP1, GNBP3 est la protéine qui présente le plus de similarités avec les β -GRPs. Les études réalisées par l'équipe de Dominique Ferrandon indiquent que GNBP3 se lie *in vitro* à la levure *Candida albicans* et à un polymère de β (1,3)-Glucane (Gottar M. et Ferrandon D. communication personnelle). L'analyse du

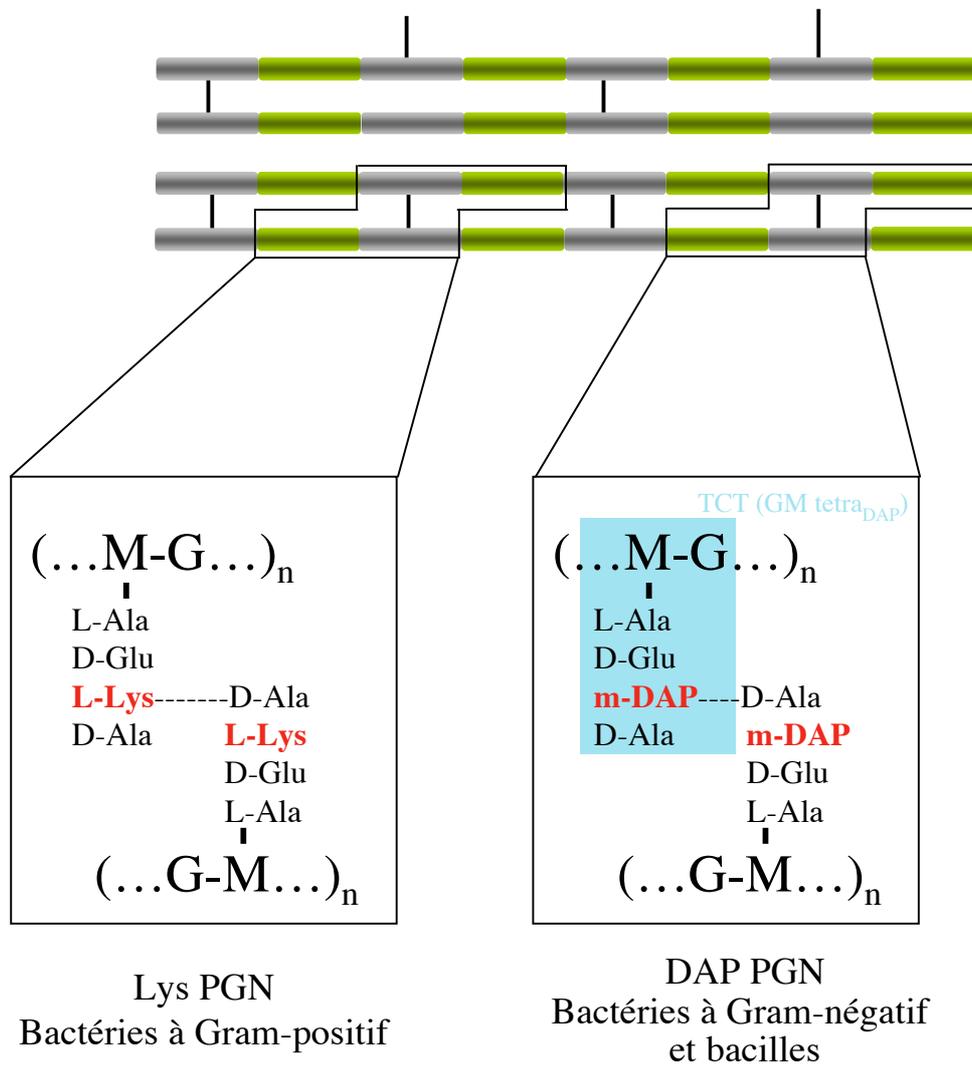


Figure 9 : Représentation schématique du peptidoglycane des bactéries à Gram-positif et -négatif (voir texte)

phénotype d'un mutant nul (*GNBP3^{hades}*) montre que GNBP3 active la voie Toll en réponse aux champignons de manière partiellement indépendante de PSH, ce qui place GNBP3 dans une branche parallèle (Figure 8). La drosophile semblerait avoir développé un système complexe de reconnaissance des infections fongiques dans lequel GNBP3 jouerait le rôle de PRR du β (1,3)-Glucane et PSH serait responsable de la détection des facteurs de virulence sécrétés par les champignons.

Trois gènes codant des «GNBP-like» sont également présents dans le génome de la drosophile. Ces molécules ont conservé un domaine N-terminal de fixation au β (1,3)-Glucane qui est peu divergent de celui de GNBP3, mais ne contiennent pas de domaine β (1,3)-Glucanase.

V. La reconnaissance du peptidoglycane dans l'immunité innée

A. Structure du peptidoglycane

Le peptidoglycane (PGN) est un des composant majeur de la paroi des bactéries. Il constitue une structure très rigide qui est en partie responsable de la forme des bactéries et qui leur permet de résister à la forte pression osmotique intracytoplasmique. Ce PGN joue un rôle essentiel dans l'intégrité cellulaire de la bactérie.

Le PGN est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées les unes aux autres par des ponts peptidiques (Figure 9). La chaîne sucrée est formée par la répétition d'unités disaccharidiques de *N*-acétylglucosamine (G) et d'acide *N*-acétylmuramique (M) (Mengin-Lecreulx and Lemaitre, 2005). La chaîne peptidique est toujours fixée sur l'acide muramique et présente la particularité d'une alternance isomérique D/L des acides aminés.

Il existe une grande diversité de structure de PGN entre les différentes espèces bactériennes qui porte essentiellement sur le pont peptidique. La première variation concerne le troisième acide aminé de ce pont. Dix résidus différents peuvent être retrouvés à cette position dont les deux plus fréquents sont la L-lysine et l'acide *meso*-DiAminoPimélique

(DAP). Le PGN des bactéries à Gram-négatif telles qu'*E. coli* contient un résidu DAP. Cet acide aminé se retrouve également dans le PGN des bactéries à Gram-positif de type bacille. Les autres bactéries à Gram-positif présentent une L-lysine à cette position (Schleifer and Kandelr, 1972). L'unité de répétition du PGN est formée du disaccharide G-M relié au tétrapeptide, L-Ala-D-Glu-meso-DAP(ou L-Lys)-D-Ala. Une autre différence majeure dans la structure du PGN des bactéries à Gram-positif réside dans la présence de ponts peptidiques intermédiaires supplémentaires dans la liaison entre les chaînes peptidiques, ceci contrairement à la liaison directe qui s'effectue entre le résidu D-Ala d'un tétrapeptide et le mesoDAP de l'autre peptide dans le PGN des bactéries à Gram-négatif. En outre, le peptide supplémentaire des bactéries à Gram-positif peut varier d'une souche à une autre. Par exemple, le PGN de *Staphylococcus aureus* possède un pont pentaglycine, celui de *Streptococcus pyogenes* contient un pont dialanine. Enfin, le résidu terminal d'acide *N*-acétylmuramique du PGN d'*E. coli* présente la particularité de posséder un pont interne 1,6-anhydre.

Le PGN n'est pas un constituant statique, mais une structure dynamique qui grandit et se renouvelle constamment. Ce remodelage a lieu lors de la croissance et de la division des bactéries et fait intervenir de nombreuses enzymes de synthèse et de dégradation. Chez la plupart des bactéries à Gram-négatif, 40 à 50% du PGN est dégradé à chaque génération et 90% de ces produits de dégradation sont réimportés dans le cytoplasme de la bactérie pour être recyclés (Park, 2001). Les fragments majeurs formés lors du renouvellement de la paroi des bactéries sont des disaccharides G-M(anh) tétra peptides générés par action d'une transglycosylase.

B. Reconnaissance de motifs spécifiques du PGN par le système immunitaire

La reconnaissance du peptidoglycane est assurée chez la drosophile par la famille des PGRPs. Cette reconnaissance conduit à l'activation des voies de signalisation Toll et IMD. La capacité de la drosophile à discriminer entre les différents types d'infection repose sur la distinction entre le PGN de type Lys des bactéries à Gram-positif, qui est reconnu par le complexe PGRP-SA/GNBP-1 et qui active la voie Toll, et le PGN de type DAP des bactéries à Gram-négatif et des bacilles, détecté par PGRP-LC et PGRP-LE conduisant à l'activation de

la voie IMD (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003; Takehana et al., 2004). La structure cristalline de PGRP-SA indique la présence d'un sillon qui pourrait être le site de fixation du PGN (Chang et al., 2004; Reiser et al., 2004). Le LPS a longtemps été considéré comme un inducteur de la réponse immunitaire de la drosophile. Cependant, les différentes études ont été réalisées avec des préparations de LPS commercial dont il a été démontré qu'elles étaient contaminées par d'autres composés bactériens. L'utilisation de LPS hautement purifié n'a pas montré d'activation de la réponse immunitaire et il est maintenant établi que le LPS n'active pas la synthèse des peptides antimicrobiens chez la drosophile (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003). Cependant, on ne peut pas exclure que le LPS induise d'autres mécanismes de défense chez la drosophile.

La dissection du motif de peptidoglycane minimal requis pour activer la voie IMD indique que les éléments de la chaîne saccharidique et du pont peptidique sont nécessaires pour la reconnaissance. Plus précisément, par l'utilisation de composés synthétiques ou isolés des bactéries, il a été démontré que la structure minimale nécessaire pour obtenir une activation optimale de la voie IMD est constituée d'un disaccharide *N*-acétylglucosamine-acide-*N*-acétylmuramique sous forme anhydre relié au tripeptide L-Ala-D-Glu-*meso* DAP (GM(anh)-tri_{DAP}) (Stenbak et al., 2004). Ce composé également appelé TCT (tracheal cytotoxin) est retrouvé dans le surnageant de culture de *Bordetella pertussis* son nom provient des lésions qu'il provoque dans les cellules épithéliales des trachées chez le hamster lors d'une infection (Goldman et al., 1982). Une modification de la partie sucrée, du peptide ou du pont anhydre du GM(anh)-tri_{DAP} résulte en une réduction importante de l'activité de ces composés. Le PGN de type DAP de la paroi des bacilles induit plus faiblement la synthèse de la Diptéricine que ce même type de PGN présent à la surface des bactéries à Gram-négatif. Nous avons vu précédemment que la forme anhydre de l'acide-*N*-acétylmuramique est importante pour une activation optimale de la voie IMD. Cette forme anhydre est moins présente dans le PGN des bacilles, ce qui pourrait expliquer la différence d'activité observée. La faible activation de la voie IMD par les bacilles pourrait également provenir de la présence du DAP sous forme amidée dans leur PGN.

Il est surprenant que les PGRPs soient capables de reconnaître un constituant microbien situé dans la paroi des bactéries, sous une couche de LPS pour les bactéries à Gram-négatif.

Ceci implique qu'il existe, préalablement à la reconnaissance du PGN, un système de dégradation de la paroi des bactéries qui disséminerait le PGN dans la circulation qui serait alors reconnu par les PGRPs. Une autre possibilité serait que l'infection bactérienne soit détectée par le PGN libéré dans l'hémolymphe lors du renouvellement de la paroi des bactéries. Cette seconde hypothèse est étayée par le fait que le constituant majeur relargué par la bactérie lors du remodelage de sa paroi est le GM(anh)-tetra_{DAP}, qui est l'une des formes du PGN qui active le mieux la réponse immunitaire (Mengin-Lecreulx and Lemaitre, 2005).

Chez les mammifères, la reconnaissance du PGN est assurée par deux familles de protéines, les PGRPs et les «Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins» (NODs) (Girardin and Philpott, 2004). Nous avons vu précédemment que les PGRPs sont capables de se lier directement au PGN. Cependant les différentes études réalisées n'ont pas permis de leur attribuer un rôle majeur dans la réponse immunitaire chez les mammifères. Les NODs forment une famille de protéines de reconnaissance intracellulaire chez les mammifères. Parmi ces protéines, NOD1 et NOD2 ont été impliquées dans la détection de l'infection à travers la reconnaissance du peptidoglycane (Royet and Reichhart, 2003). NOD1 reconnaît spécifiquement le PGN de type DAP des bactéries à Gram-négatif par la détection du motif GM-Tri_{DAP}. La structure D-Glu-*meso*-DAP est également reconnue par NOD1 mais avec une avidité plus faible, ce qui suggère un rôle important de la L-Ala dans la détection. NOD2 est une protéine de détection universelle pour les bactéries. En effet, le motif reconnu, le M-dipeptide, est présent dans le PGN de toutes les bactéries. Ces protéines sont impliquées dans la réponse inflammatoire. Par exemple, des mutations dans le gène *nod2* sont associées à une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, la maladie de Crohn, et à une maladie auto-inflammatoire qui affecte les yeux et les articulations, appelée syndrome de Blau (Hugot et al., 2001; Miceli-Richard et al., 2001; Ogura et al., 2001). La détection du PGN par les protéines NODs cytosoliques nécessite la présence du ligand à l'intérieur de la cellule. Les études réalisées sur la souche invasive *Shigella flexneri* indiquent que la virulence de la bactérie requiert son entrée dans les cellules épithéliales expliquant ainsi la présence du PGN dans la cellule (Dorman et al., 2001). Les bactéries non invasives telles qu'*Helicobacter pylori*, utiliseraient un système de sécrétion de type IV pour injecter directement leur PGN dans la cellule (Philpott et al., 2002).

VI. Objectifs de ce travail

L'objectif principal de ma thèse a été de décrypter les mécanismes utilisés par la drosophile pour détecter l'infection. En particulier, j'ai focalisé mon attention sur la famille des PGRPs. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, différentes études avaient démontré le rôle de certains PGRPs en tant que récepteurs de l'immunité innée. De manière surprenante, pour une famille qui compte un nombre important de protéines, il ne semblait pas y avoir de redondance fonctionnelle.

La première étude que j'ai réalisée a concerné PGRP-LC qui existe chez la drosophile sous trois formes différentes. Je me suis attachée à déterminer *in vivo* le mécanisme d'action de cette protéine en amont de la voie IMD ainsi que le rôle de chacune de ses isoformes.

Tous les PGRPs étudiés *in vivo* jusqu'à présent font partie des PGRPs qui ne possèdent pas d'activité enzymatique. Un autre projet sur lequel j'ai travaillé au cours de ma thèse a porté sur les PGRP-SC1 et PGRP-SC2. Ces PGRPs possèdent les acides aminés conservés les incluant dans la famille des amidases.

Enfin, les résultats que j'ai obtenu au cours de l'étude sur le récepteur PGRP-LC ont porté mon attention sur PGRP-LF. L'analyse de mutants pour cette nouvelle protéine a permis d'élargir les rôles démontrés pour les membres de la famille des PGRPs à une interface avec le développement.

RESULTATS

CHAPITRE I

Mode d'action de PGRP-LC en amont de la voie Imd

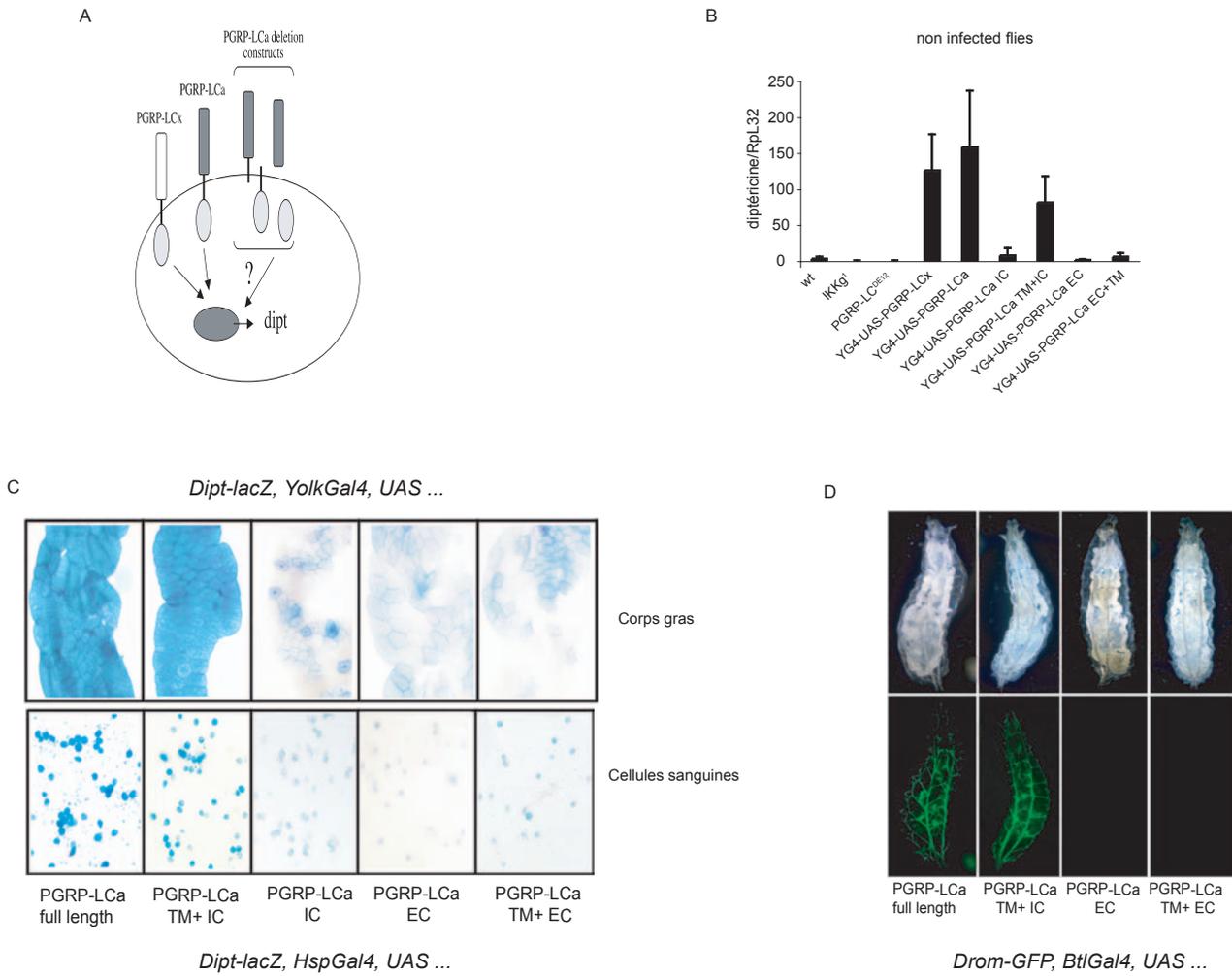


Figure 10 : Etude structure-fonction de PGRP-LC

A. Représentation schématique de la structure de PGRP-LC et des différentes constructions réalisées

Effet de la surexpression des différentes constructions sur la synthèse des peptides antimicrobiens en absence d'infection bactérienne : Quantification de la *Diptéricine* par Q-RT-PCR (B), Marquage *Dipt-lacZ* sur le corps gras larvaire et les cellules sanguines (C), Expression de la *Drosomycine* visualisée par un gène rapporteur *Drom-GFP* au niveau des trachées larvaires (D)

I. Mode d'action de PGRP-LC en amont de la voie IMD

A. Analyse structure fonction de PGRP-LC

1. Introduction

L'infection par des bactéries à Gram-négatif induit l'expression de nombreux gènes suite à l'activation de la voie IMD. La détection de l'infection s'effectue par l'intermédiaire du récepteur PGRP-LC qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule et conduit à la translocation nucléaire du transactivateur Relish. Cependant, le mode d'activation de la voie IMD suite à la reconnaissance du PGN par PGRP-LC reste inconnu, d'autant plus que le domaine intracytoplasmique de PGRP-LC ne possède aucune homologie avec d'autres récepteurs connus. Pour comprendre le mode d'action de PGRP-LC en amont de la voie IMD, nous avons réalisé une étude structure-fonction de ce récepteur.

PGRP-LC est une protéine transmembranaire constituée de 3 domaines, un domaine extracellulaire qui contient le domaine PGRP, un domaine transmembranaire et une partie intracytoplasmique. Pour disséquer les mécanismes à l'origine de la reconnaissance et de la transduction du signal, j'ai généré des drosophiles transgéniques exprimant des molécules PGRP-LC tronquées. Les constructions suivantes ont été réalisées □ le domaine extracellulaire (EC) seul ou couplé au domaine transmembranaire (EC+TM) et le domaine intracytoplasmique seul (IC) ou attaché à la membrane par le domaine transmembranaire (TM+IC) (figure 10 A).

L'effet de la surexpression de ces différentes constructions a été étudié *in vivo* sur l'activation de la voie IMD et sur la survie, tout d'abord au cours d'une surexpression simple en l'absence d'infection, puis au cours d'une infection par des bactéries à Gram-négatif et enfin sur la capacité de ces constructions à compléter le phénotype mutant protéine nulle PGRP-LC (PGRP-LC^{E12}).

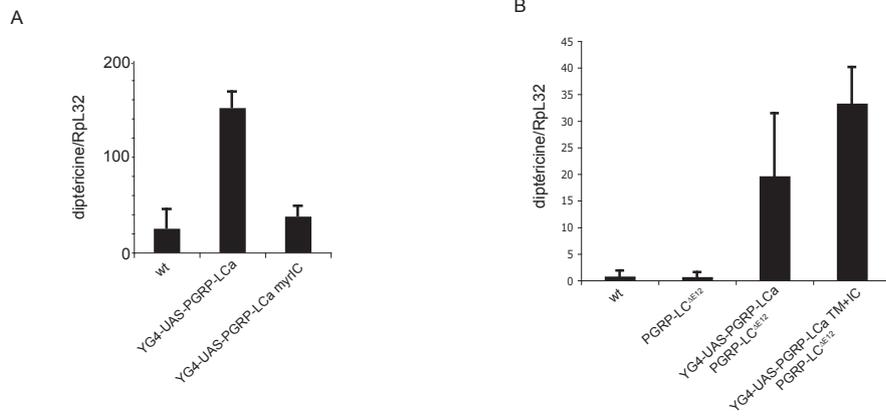


Figure 11 : Rôle du domaine transmembranaire dans la signalisation via le récepteur PGRP-LC

A. Effet de la surexpression de la construction myrIC sur l'expression de la *Diptéricine* en absence d'infection

B. Surexpression de la construction TM+IC en contexte mutant PGRP-LC

2. Résultats

Nous avons tout d'abord regardé l'effet de la surexpression des différentes constructions sur la synthèse des peptides antimicrobiens en l'absence d'infection. Nous avons observé que la surexpression de EC et TM+EC n'est pas suffisante pour induire l'expression de la *Diptéricine* (figure 10 B). En revanche, les drosophiles surexprimant la construction TM+IC sont capables en l'absence d'infection d'activer la synthèse de la *Diptéricine* dans le corps gras (figure 10 C). La quantification indique que le niveau d'induction de la *Diptéricine* par cette construction est équivalente à celle observée lors de la surexpression de la forme complète de PGRP-LC (figure 10 B). Nous pouvons également voir que la surexpression de la forme sauvage de PGRP-LCa ainsi que de la construction TM+IC induit l'expression de la *Diptéricine* dans les cellules sanguines (figure 10 C). D'autre part, la voie IMD étant impliquée dans la réponse locale, nous avons analysé l'effet de ces constructions sur la synthèse des peptides antimicrobiens au niveau des epithelia. Pour cela, nous avons surexprimé les différentes constructions à l'aide du driver *BreathlessGal4* spécifique des trachées. Nous remarquons que la surexpression de la forme complète de PGRP-LCa ainsi que la construction TM+IC induisent la synthèse constitutive de la drosomycine dans les trachées chez les larves (figure 10 D).

L'absence d'induction de la *Diptéricine* par la surexpression du domaine intracytoplasmique seul nous renseigne sur l'importance du domaine transmembranaire dans l'activation de la voie IMD. Nous avons alors formulé deux hypothèses quant à la nécessité de ce domaine transmembranaire. Tout d'abord, il pourrait jouer un rôle dans la localisation membranaire du domaine intracytoplasmique de PGRP-LC qui peut être nécessaire pour la signalisation. Ensuite, le domaine transmembranaire pourrait participer à la signalisation. Pour tester la première hypothèse, nous avons réalisé une construction contenant le domaine intracytoplasmique couplé à une séquence de myristoylation qui permet d'ancrer le domaine IC à la membrane cytoplasmique. Nous avons observé que cette construction n'est pas capable d'activer de manière constitutive la *Diptéricine* (figure 11 A). Ce résultat nous indique que le domaine transmembranaire semble posséder un autre rôle que celui de la localisation membranaire du domaine IC. Nous pouvons penser que ce domaine puisse jouer un rôle dans la signalisation par exemple dans la formation d'un dimère PGRP-LC. Dans ce contexte, et pour tester la seconde hypothèse, nous avons voulu savoir si l'induction de la

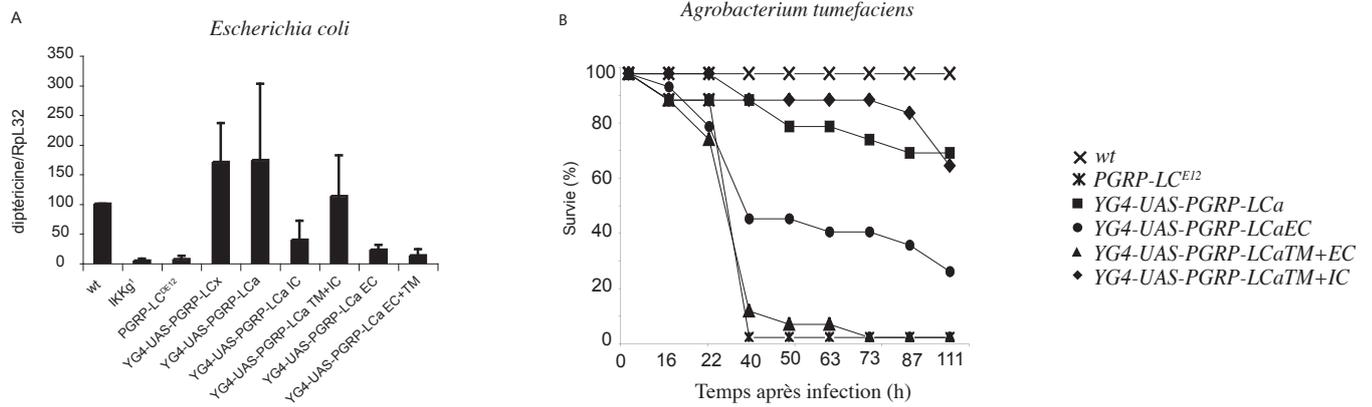


Figure 12 : Effet de la surexpression des différentes constructions de PGRP-LC sur l'activation de la voie IMD (A) et sur la survie (B) après infection bactérienne

Les constructions EC et EC+TM ainsi que le domaine IC présentent un effet dominant négatif important sur la synthèse de la *Diptéricine* et sur la survie après infection.

Diptéricine par la construction TM+IC était due à une hétérodimérisation avec la protéine PGRP-LC endogène. Pour cela, nous avons étudié la capacité de la construction TM+IC à induire la *Diptéricine* sans infection dans un contexte mutant PGRP-LC. Nous avons observé que la surexpression de cette construction en contexte PGRP-LC mutant conduit toujours à une activation constitutive de la voie IMD (figure 11 B). Nous concluons de ce résultat que le domaine transmembranaire et la partie intracytoplasmique renferment l'information nécessaire pour la signalisation.

L'ensemble de ces observations nous permet de proposer un modèle pour l'activation de la voie IMD par PGRP-LC. Dans notre modèle, la reconnaissance de la bactérie par le domaine PGRP de PGRP-LC induirait la dimérisation du récepteur et permettrait l'activation de la voie IMD. L'expression ectopique de la version sauvage de PGRP-LC mimerait cet effet par agrégation artificielle et conduirait à la signalisation en l'absence de microorganismes.

Dans un second temps, nous avons analysé l'effet de la surexpression des différentes constructions sur la synthèse des peptides antimicrobiens après une infection bactérienne. L'infection d'une souche sauvage par la bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli* conduit à l'expression de la *Diptéricine*. Cette production de *Diptéricine* est abolie dans les mutants *IKK^{key1}* (mutant du signalosome) et *PGRP-LC*. Nous pouvons observer que la surexpression des constructions EC et EC+TM conduit à un effet dominant négatif. En effet, dans les drosophiles qui surexpriment les constructions EC ou EC+TM, l'activité transcriptionnelle de la *Diptéricine* est fortement réduite après infection (figure 12 A). Nous obtenons les mêmes résultats après infection par une autre bactérie à gram-négatif, *Agrobacterium tumefaciens*. Nous avons également observé que ce défaut de synthèse de la *Diptéricine* est corrélé à une forte susceptibilité de ces mouches à l'infection (figure 12 B). Nous émettons l'hypothèse que lors d'une infection, les domaines EC surexprimés séquestrent les bactéries dans l'hémolymphe, empêchant ainsi leur reconnaissance par les molécules PGRP-LC endogènes et donc l'induction de la voie IMD en réponse à l'infection.

D'autre part, la surexpression du domaine intracytoplasmique de PGRP-LC conduit à une diminution de l'expression de la *Diptéricine* après infection. Cette diminution est corrélée à une susceptibilité des mouches à la piqûre par *E.coli* (figure 12 A). Le domaine IC agit donc

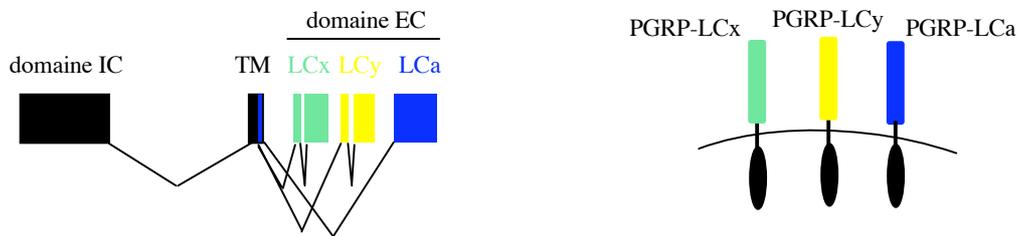


Figure 13 : Les isoformes de PGRP-LC

Représentation du locus PGRP-LC et topologie des isoformes. Les rectangles représentent les différents exons. Les domaines TM et IC sont communs aux trois isoformes PGRP-LCx, -LCy et -LCa qui possèdent chacune un domaine EC différent. IC : intracytoplasmique, TM : transmembranaire, EC : extracellulaire

comme dominant négatif lors d'une infection bactérienne. Nous suggérons que la détection des microorganismes induit la dimérisation de PGRP-LC qui, sous cette forme active, serait alors capable de lier une molécule en aval permettant ainsi la signalisation. Nous proposons que la grande quantité de domaine IC produite lors de la surexpression séquestre cette molécule adaptatrice et empêche l'activation de la voie IMD.

3. Conclusions

Nous avons mis en évidence au cours de cette étude que les domaines transmembranaire et intracytoplasmique de PGRP-LC sont importants pour la signalisation en amont de la voie IMD. Il semble également que ces deux domaines renferment les informations suffisantes pour transmettre le signal. L'effet dominant négatif observé lors de la surexpression de la partie intracytoplasmique laisse penser que la signalisation intracellulaire s'effectue par l'intermédiaire d'une molécule adaptatrice interagissant directement avec PGRP-LC. Au cours de notre étude, un autre laboratoire s'est intéressé à la signalisation via PGRP-LC en utilisant une approche biochimique (Choe et al., 2005). En accord avec nos résultats, cette équipe montre par une étude biochimique que le domaine IC de PGRP-LC est crucial pour l'activation de la voie IMD et qu'il est essentiel à la formation de dimères PGRP-LC. De plus, ces auteurs démontrent une interaction directe entre PGRP-LC et IMD. IMD serait alors la molécule adaptatrice, dont nous suggérons l'existence, nécessaire en aval de PGRP-LC pour activer la voie de signalisation.

B. Les isoformes de PGRP-LC

1. Introduction

Un épissage alternatif permet de générer à partir du gène de PGRP-LC, trois isoformes, notées a, x et y (figure 13). Ces 3 protéines possèdent les mêmes domaines transmembranaire et intracytoplasmique mais des domaines PGRPs extracellulaires différents qui présentent entre eux moins de 40% d'identité (Choe et al., 2002).

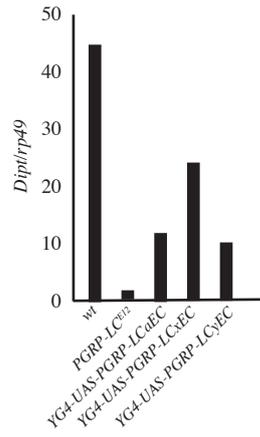


Figure 14 : Effet dominant négatif des isoformes de PGRP-LC

La surexpression du domaine extracellulaire de chacune des isoformes de PGRP-LC montre un phénotype de dominant négatif après infection par *Agrobacterium tumefaciens*.

Au cours de notre étude structure-fonction sur PGRP-LC, nous avons observé que le domaine extracellulaire de l'isoforme PGRP-LCa, alors étudiée, se comportait comme dominant négatif lors d'une infection bactérienne. Nous avons alors émis l'hypothèse que ce domaine séquestrerait les bactéries qui ne seraient alors plus accessibles pour les molécules PGRP-LC endogènes présentes à la surface des cellules et capables de signaler grâce à leur domaine intracytoplasmique. En nous intéressant à l'effet de la surexpression des domaines EC des deux autres isoformes, PGRP-LCx et PGRP-LCy, nous avons constaté que leur surexpression conduisait également à un effet dominant négatif lors d'une infection (figure 14)

Afin d'étudier plus précisément le rôle des différentes isoformes de PGRP-LC dans la réponse immunitaire, j'ai généré différentes lignées de drosophiles présentant une inactivation spécifique de chacune des isoformes grâce à la technique de l'interférence à l'ARN. Cette technique permet chez la drosophile, par la surexpression d'un ARN double brin spécifique de la séquence que l'on veut invalider, de déclencher le mécanisme d'interférence à l'ARN dont le principe est expliqué figure 15 et qui conduit à la dégradation spécifique de l'ARN messager du gène d'intérêt (Kennerdell and Carthew, 2000). La spécificité des ARN double-brin construits pour PGRP-LC a été évaluée en utilisant la banque de données générés dans le laboratoire de M. Boutros (Arziman et al., 2005). Cette analyse nous indique que l'expression de l'ARN double brin d'une isoforme conduirait à la dégradation spécifique de cette isoforme, cependant il nous reste à vérifier ceci *in vivo* par quantification des différents transcrits.

2. Résultats

Nous avons dans un premier temps testé l'effet de l'invalidation de chacune des trois isoformes de PGRP-LC sur la synthèse des peptides antimicrobiens après infection bactérienne. Nous observons, pour toutes les souches à Gram-négatif utilisées, que la diminution de l'expression de chacune des isoformes diminue l'expression de la *Diptéricine* après infection par rapport à des mouches sauvages (figure 16). Cependant, la réduction n'est jamais aussi importante que dans le mutant PGRP-LC^{□E12} qui est une délétion des trois isoformes. La détection de l'infection s'effectue par la reconnaissance du PGN de type DAP des bactéries à Gram-négatif. Ce type de PGN est également retrouvé dans la paroi des

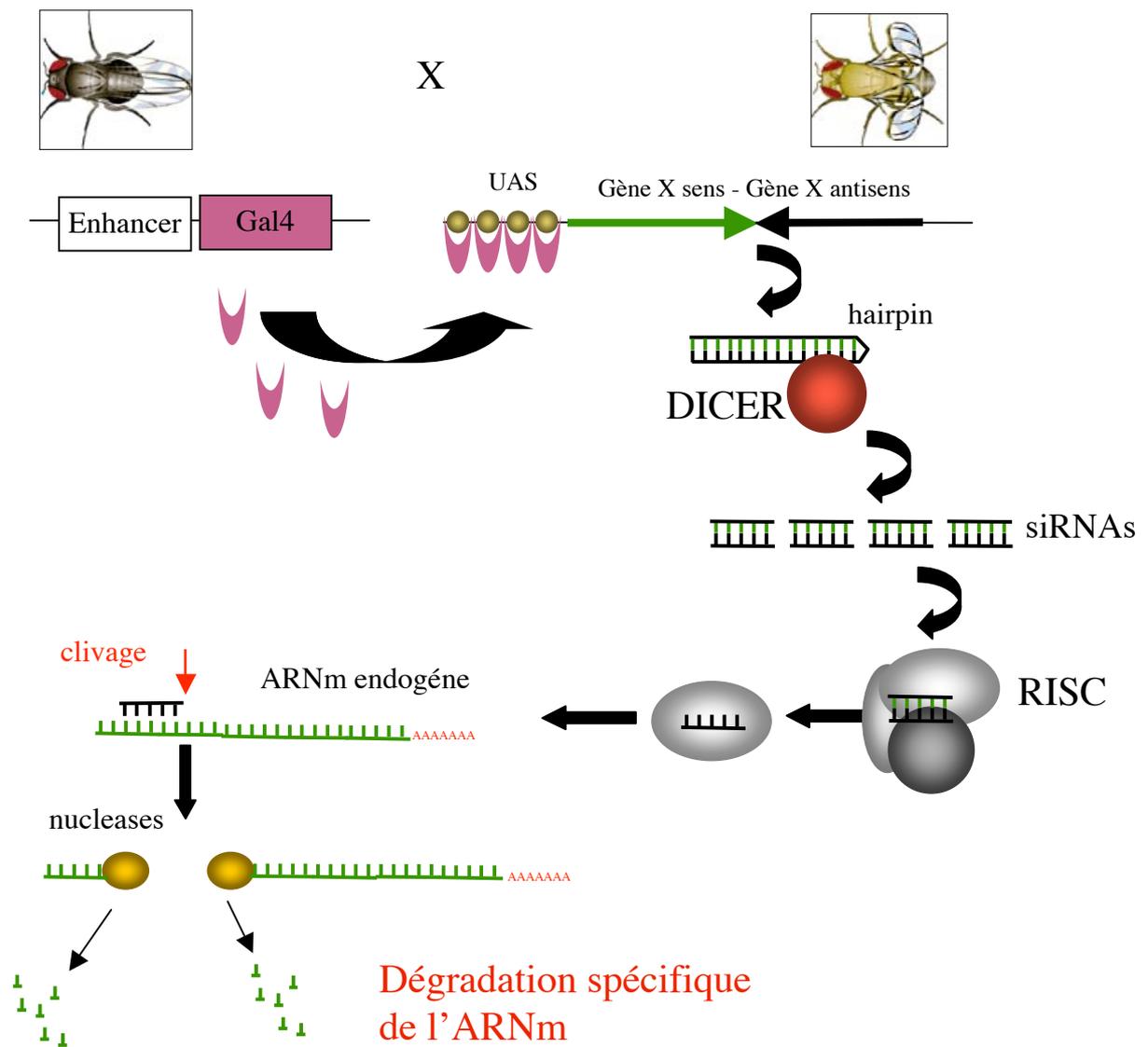


Figure 15 : Principe de l'interférence à l'ARN *in vivo* chez la drosophile

L'expression de l'ARN double brin est obtenue en croisant une lignée de drosophile portant un driver (enhancer Gal4), avec la souche qui possède le gène d'intérêt dont on veut réduire l'expression, cloné en position tête-bêche. L'ARN double brin est ensuite reconnu et clivé par Dicer. Les **Small interfering RNA** (siRNA) générés sont pris en charge par le complexe «**RNA Induced Silencing Complex**» (RISC). Les siRNA vont se fixer sur l'ARNm du gène endogène par complémentarité de séquence et induire la dégradation spécifique de ce gène.

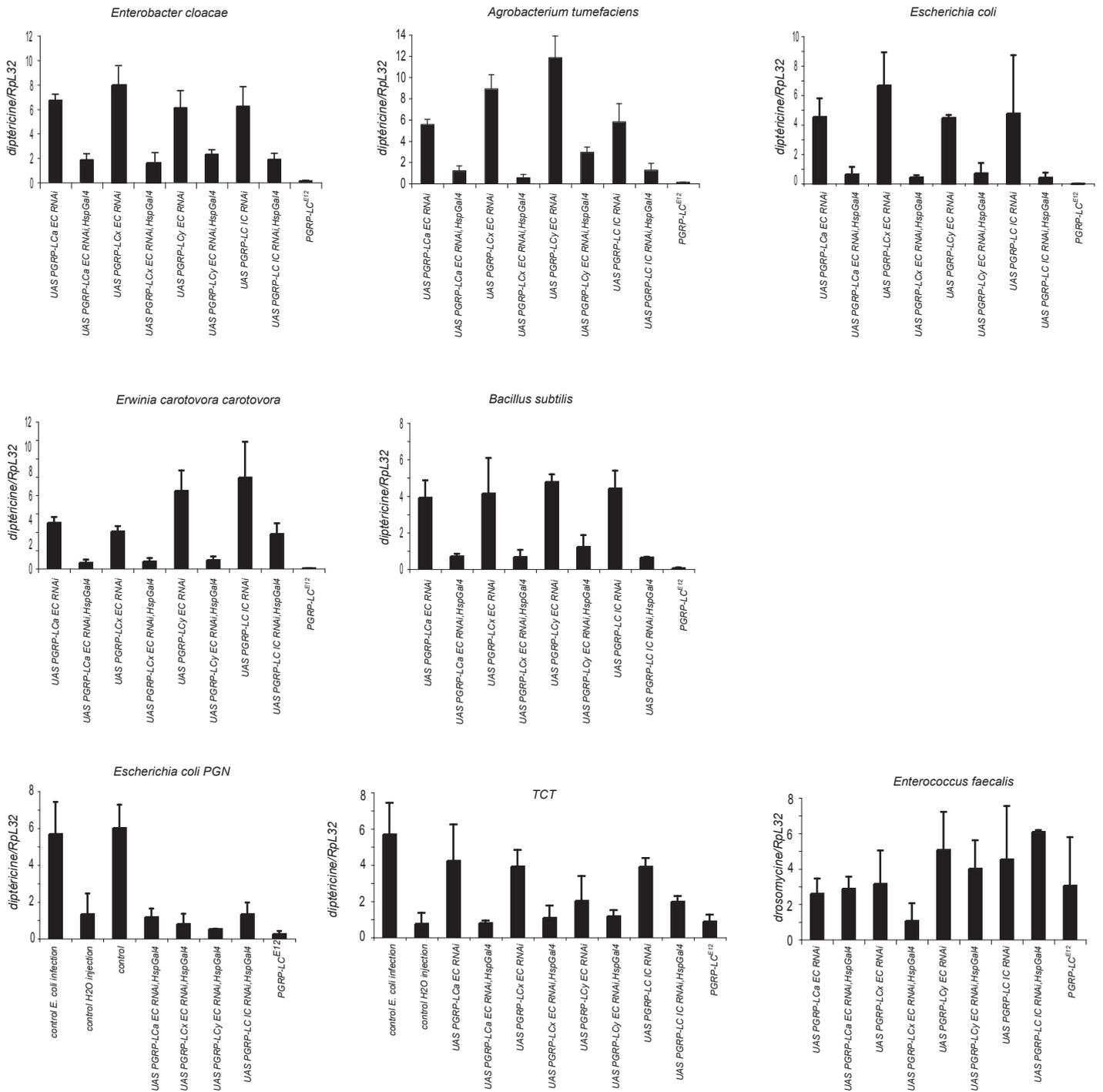


Figure 16 : Effet de l'inactivation des isoformes de PGRP-LC sur l'activation de la voie IMD

La diminution de chacune des isoformes de PGRP-LC entraîne une réduction de l'expression de la *Diptéricine* après infection par les bactéries à Gram-négatif, les bacilles et l'injection du PGN purifié d'*E.coli* ou du TCT.

En revanche, l'inactivation des isoformes de PGRP-LC n'a pas d'effet sur la synthèse de la drosomycine après infection par la bactéries à Gram-positif *E. faecalis*.

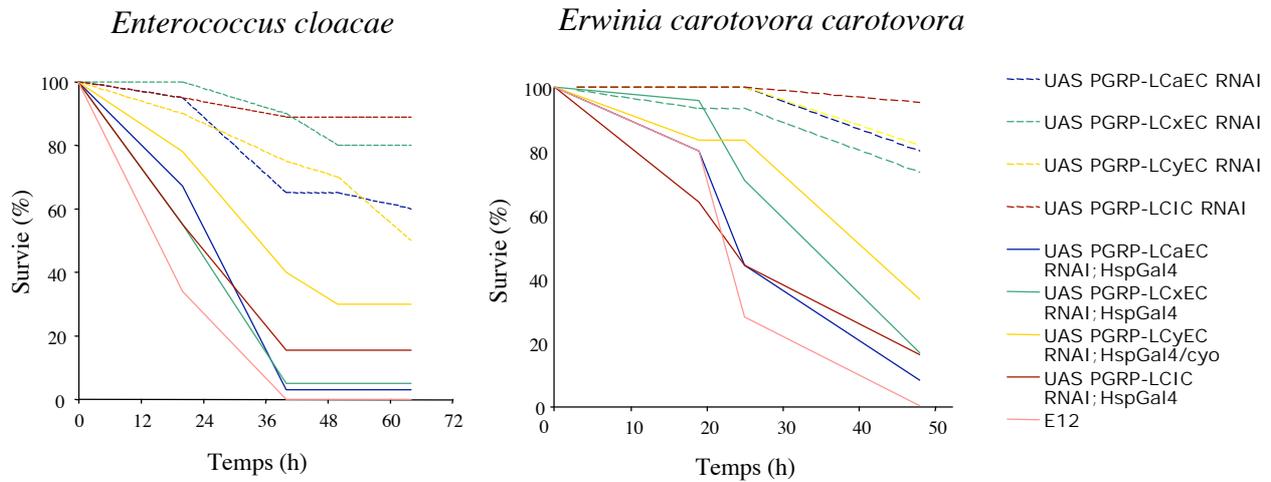


Figure 17 : Survie à *Enterococcus cloacae* et *Erwinia carotovora carotovora* des drosophiles invalidées pour chacune des isoformes de PGRP-LC

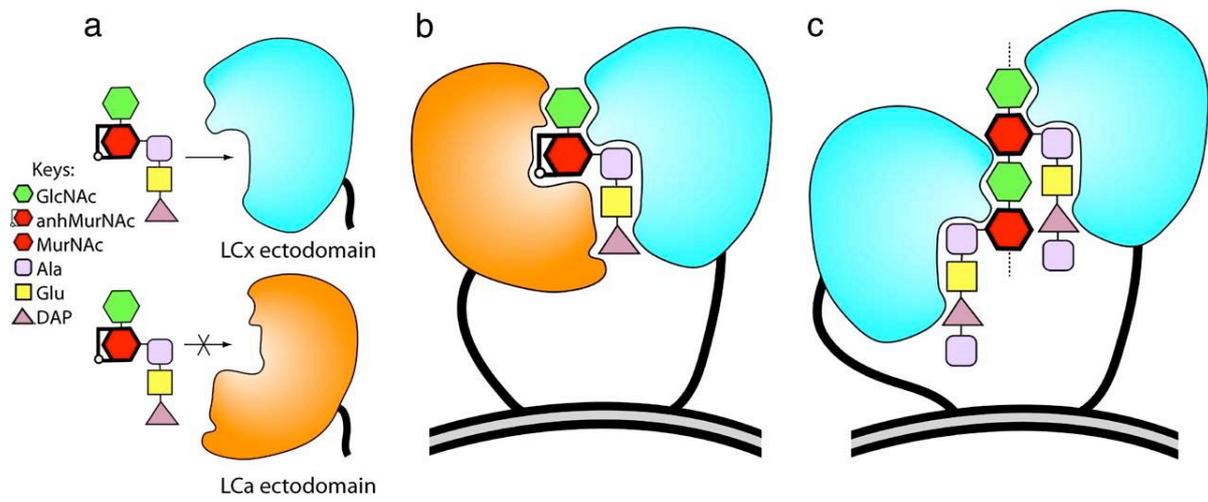
L'expression de l'ARN double brin a été induite par un choc thermique de 30 minutes à 37°C. Les drosophiles ont ensuite été placées à 25°C pendant 3 heures avant la piqûre septique. Nous observons que l'invalidation de chacune des isoformes entraîne une susceptibilité des drosophiles à l'infection par comparaison aux mouches sauvages.

bactéries à Gram-positif de type bacille. Nous avons alors testé l'activation de la voie IMD par les bacilles. Cette expérience a conduit au même résultat. En effet, nous observons que l'invalidation de chacune des isoformes se traduit par une diminution de la production de la *Diptéricine* en réponse à une infection par *Bacillus subtilis* par comparaison aux drosophiles sauvages. En revanche, l'invalidation des différentes isoformes n'a pas d'effet sur la synthèse de la drosomycine après infection par la bactérie à Gram-positif *Enterococcus faecalis*. Ces résultats sont fortement corrélés avec la survie après infection. En effet, nous observons que les drosophiles déplétées pour chacune des isoformes sont susceptibles à l'infection par les bactéries à Gram-négatif par rapport aux drosophiles contrôles (figure 17). Nous avons par la suite testé l'effet de l'invalidation des différentes isoformes de PGRP-LC après injection du PGN d'*E.coli* et du TCT. Nous avons alors observé que la synthèse de la *Diptéricine* est réduite lors de l'invalidation de chacune des trois isoformes après injection de ces deux inducteurs par comparaison à l'activation observée chez des drosophiles sauvages (figure 16).

3. Conclusions et discussion

Nous avons montré au cours de cette étude que l'inactivation de chacune des trois isoformes de PGRP-LC présente les mêmes effets sur l'activation de la voie IMD en réponse à une infection bactérienne. Ces résultats suggèrent que ces trois protéines sont nécessaires pour développer une réponse efficace lors d'une infection bactérienne à Gram-négatif et qu'elles ne sont pas redondantes. Chacune de ces trois protéines semble intervenir dans la détection du peptidoglycane, probablement en formant un complexe multiprotéique de reconnaissance.

Précédemment, deux études ont été réalisées *in vitro* afin de déterminer la spécificité de reconnaissance des trois isoformes de PGRP-LC envers les motifs microbiens. Ces études ont conduit à des résultats différents. La première montre que la reconnaissance du PGN ne ferait intervenir que PGRP-LCx alors que le LPS nécessiterait PGRP-LCa et PGRP-LCx (Werner et al., 2003). La seconde indique que le PGN polymérique serait reconnu par PGRP-LCx et que le monomère TCT nécessiterait une reconnaissance par les deux isoformes a et x (Kaneko et al., 2004). En revanche, dans ces 2 études, il est montré que l'isoforme y n'a pas d'implication dans la réponse immunitaire.



Chang et al., PNAS 2005

Figure 18 : Modèle proposé par Chang et coll. pour la reconnaissance du peptidoglycane par PGRP-LCa et -LCx (voir texte)

La résolution de la structure cristalline des PGRPs de drosophiles LB et SA et des PGRPs humains I□ et S ont montré la présence d'un site potentiel de fixation du PGN (Chang et al., 2004; Guan et al., 2004; Guan et al., 2005b; Kim et al., 2003). La structure cristalline du domaine extracellulaire de PGRP-LCa indique que cette protéine ne possède pas de sillon pour la fixation du PGN et arbore une conformation plus fermée (Chang et al., 2005). Cette étude montre également que PGRP-LCa ne se lie pas au GM(anh)-tetra_{DAP}, contrairement à PGRP-LCx (figure 18 a). Ce résultat a ensuite été confirmé par une autre équipe (Mellroth et al., 2005). Les auteurs proposent que la fixation du muropetide sur PGRP-LCx entraîne un changement de conformation du domaine extracellulaire de cette protéine qui permettrait alors la fixation de PGRP-LCa (figure 18 b). Ce complexe formerait alors le récepteur actif, la présence de PGRP-LCa étant nécessaire pour la signalisation lors de la détection d'un PGN monomérique. Ce modèle permet d'expliquer pourquoi PGRP-LCa n'est pas requis pour la réponse au PGN polymérique qui s'effectuerait par une homodimérisation de PGRP-LCx (figure 18 c).

Les effets de DN que nous avons obtenus lors de la surexpression du domaine EC de PGRP-LCa ou lors des expériences d'inactivation indiquent un rôle important pour cette isoforme dans la réponse aux infections. Nos résultats ne concordent pas complètement avec les différents modèles proposés au cours des études réalisées *in vitro*. Ces études indiquent en effet que l'activation de la voie IMD par le PGN polymérique ne nécessite pas l'intervention de PGRP-LCa. Nos expériences portant sur des bactéries entières et sur le PGN polymérique purifié à partir d'*E.coli* confèrent un rôle à l'isoforme a dans la signalisation. Nos expériences ne permettent pas de déterminer si LCa se fixe au PGN. Nous proposons que l'incapacité des drosophiles à induire la synthèse de la *Diptéricine* était due à un titrage des bactéries par le domaine EC de PGRP-LCa surexprimé. Nous pouvons aussi penser que le PGN polymérique se fixe sur PGRP-LCx qui devient alors attractif pour PGRP-LCa. Nos résultats nous laissent supposer que le récepteur actif en amont de la voie IMD est composé par un complexe multiprotéique des isoformes de PGRP-LC. La reconnaissance du PGN conduirait au rapprochement des domaines IC nécessaire pour signaler, dont l'interaction a été récemment démontré (Choe et al., 2005). L'absence d'un domaine IC dans la construction EC pourrait expliquer l'incapacité de la drosophile à induire l'expression de la *Diptéricine*.

Des études complémentaires sont maintenant nécessaires pour comprendre le rôle exact de PGRP-LCa dans la signalisation suite à la reconnaissance du PGN. En effet, aucun changement de conformation du domaine PGRP n'a été observé après fixation du MTP sur PGRP-I□ (Guan et al., 2005a). Il serait également intéressant de savoir si après reconnaissance du PGN par PGRP-LCx, PGRP-LCa se fixe sur cette protéine ou au PGN présenté par PGRP-LCx.

Dans notre étude, nous montrons également que l'isoforme y participe à la réponse au PGN. La structure cristalline de PGRP-LCa indique des différences importantes avec celle de PGRP-LCx qui expliquent son incapacité à lier le PGN. La séquence protéique de PGRP-LCy montre un degré d'identité plus important avec PGRP-LCx qu'avec PGRP-LCa, ce qui suggérerait que cette isoforme puisse fixer le PGN (Chang et al., 2005). La résolution de la structure cristalline ainsi que des essais de fixation du PGN en utilisant cette isoforme seraient intéressants pour approfondir l'étude de son rôle dans la réponse à l'infection.

Introduction aux chapitres II et III

Chez la drosophile, la voie IMD est nécessaire pour la défense immunitaire lors d'une infection par des bactéries à Gram-négatif. Les mutants pour les différents membres de cette voie de signalisation meurent rapidement après infection et ne sont plus capables de synthétiser les peptides antibactériens comme la *Diptéricine*. La détection d'une infection bactérienne s'effectue par la reconnaissance du PGN par le récepteur PGRP-LC. Ceci active la cascade intracytoplasmique et conduit à la translocation nucléaire de Relish qui induit l'expression de nombreux gènes cibles.

D'autre part, la voie IMD présente de nombreuses similarités avec la voie du TNF des mammifères qui est impliquée dans les mécanismes d'apoptose. Par exemple, Dredd chez la drosophile est l'homologue de la caspase 8 et IMD l'homologue de l'adaptateur RIP. Il a été démontré que la surexpression d'IMD provoque la mort de l'animal et induit l'expression du gène *reaper*, un effecteur de l'apoptose (Georgel et al., 2001). De plus, nous avons observé que la surexpression de la protéine PGRP-LC est également létale pour la drosophile.

L'implication de la voie IMD dans ces deux processus antagonistes indique qu'il est important de contrôler l'activation de cette voie de manière fine pour permettre la synthèse des peptides antimicrobiens lors d'une infection sans pour autant déclencher l'apoptose.

Au cours de ma thèse, l'étude de différents membres de la famille des PGRPs a démontré un rôle pour ces protéines dans la régulation de la voie IMD. La première étude a porté sur des PGRPs à activité amidase, PGRP-SC1 et PGRP-SC2. Les résultats que nous avons obtenus démontrent que ces protéines exercent un contrôle en amont de la voie IMD par la titration du ligand disponible pour activer le récepteur PGRP-LC. La seconde étude, indique de façon préliminaire un rôle pour PGRP-LF dans le contrôle de l'activation de cette voie par un mécanisme différent de celui des PGRP-SC mais qu'il reste à déterminer. Les résultats de ces études sont présentés dans les deux chapitres suivants.

CHAPITRE II

Rôle des PGRP à activité amidase

II. Rôle des PGRPs à activité amidase

A. Introduction

Les PGRPs possèdent des similarités de séquences notables avec les amidases *N*-acetylmuramyl-L-alanine (NAMLAA) qui sont des enzymes capables d'hydrolyser le peptidoglycane. La conservation de certains résidus d'acides aminés entre le lysozyme et les PGRPs indique que certains PGRPs auraient conservé cette fonction amidase (voir figure 7). De manière intéressante, les PGRPs pour lesquels une fonction de récepteur de l'immunité a été démontrée (PGRP-LC, SA, LE, SD) ne possèdent pas ces résidus essentiels à l'activité enzymatique. En effet, dans ces protéines, la cystéine qui participe à la liaison au zinc est remplacée par une sérine.

Le rôle des PGRPs possédant une activité amidase potentielle n'a pas été étudié *in vivo* chez la drosophile. Une étude réalisée sur des souris mutantes pour l'homologue PGRP-L n'a pas montré de phénotype immunitaire évident. D'autre part, une étude réalisée *in vitro* a montré que PGRP-SC1b possède une activité amidase (Mellroth et al., 2003). L'analyse des fragments de coupure montre que PGRP-SC1 est une enzyme de la famille des NAMLAA et qu'elle clive le PGN entre l'acide *N*-acétylmuramique de la chaîne sucrée et le premier acide aminé du pont peptidique. Cette coupure rend alors le PGN moins immunogène.

Chez la drosophile, la protéine PGRP-SC1 est codée par deux gènes nommés a et b. Ces gènes sont codés dans le génome dans un cluster en position 44E qui contient également *PGRP-SC2*. Les séquences génomiques de *PGRP-SC1a* et *b* ne diffèrent que par trois nucléotides, et présentent 74% d'identité avec le transcrit de *PGRP-SC2*. D'autre part, un arbre phylogénétique réalisé avec les domaines PGRPs des différents membres de cette famille montre que ces trois transcrits appartiennent au même groupe et dérivent directement d'un ancêtre commun. Pour éviter des problèmes éventuels de redondance, nous avons décidé de muter ces trois gènes (*PGRP-SC1a* et *b* et *PGRP-SC2*) simultanément par la technique de l'interférence à ARN (voir principe figure 15) (Kennerdell and Carthew, 2000). La présence de longues séquences conservées entre ces deux transcrits nous a permis de générer une seule lignée de drosophile pour diminuer simultanément l'expression de *PGRP-SC1* et *PGRP-SC2*.

B. Résultats

L'analyse du phénotype des drosophiles déplétées pour ces amidases et la caractérisation du rôle de ces PGRPs dans la réponse immunitaire de la drosophile sont décrites dans un manuscrit soumis à *Developmental Cell*.

Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by PGRP-amidases Prevents Infection Induced Developmental Defects

Vincent Bischoff^{1*}, Cécile Vignal^{1*}, Bernard Duvic², Ivo G. Boneca³, Jules A. Hoffmann¹ & Julien Royet^{1†}

Manuscrit soumis à *Developmental cell*

Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by PGRP-amidases Prevents Infection Induced Developmental Defects

Vincent Bischoff^{1*}, Cécile Vignal^{1*}, Bernard Duvic², Ivo G. Boneca³, Jules A. Hoffmann¹ & Julien Royet^{1†}

¹Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

UPR 9022 du CNRS

15 rue René Descartes

67084 Strasbourg cedex

France

² *Unité EMIP UMR INRA-UMII 1133*

Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon

34095 Montpellier, France

³*Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux*

75724 Paris Cedex 15, France

**These authors contributed equally to this work*

[†] Present address: IBDM/LGPD, Campus de Luminy 13288 Marseille cedex 09 France

Running title: Role of PGRP-Amidases in *Drosophila* Immune Response

Summary

Peptidoglycan Recognition Proteins are evolutionarily conserved molecules structurally related to bacterial *N*-acetyl-muramoyl-L-alanine amidases. Several *Drosophila* PGRPs have lost this enzymatic activity and serve as microbial sensors through peptidoglycan recognition. Other PGRP family members such as *Drosophila* PGRP-SC1 or mammalian PGRP-L have conserved the amidase function and are able to cleave PGN *in vitro*. However, the contribution of these amidase-PGRPs to the host defense *in vivo* has remained elusive so far. We have now addressed the function of two PGRPs with amidase activity in the *Drosophila* immune response. We observed that PGRP-SC1 and PGRP-SC2 depleted flies present a specific over-activation of the IMD signalling pathway after bacterial challenge. Our data suggest that these proteins act in the larval gut to prevent activation of this pathway following bacterial ingestion. We further show that a strict control of IMD pathway activation is essential to prevent bacterially induced developmental defects and larval death.

Introduction

The antimicrobial host defense of *Drosophila* involves rapid synthesis of small-sized cationic peptides by the fat body (Bulet et al., 2002; Zasloff, 2002). These antimicrobial peptides are released into the open circulatory system where they attack the invading micro-organisms. The transcription of the genes encoding these peptides is under the control of two distinct signalling pathways. The Toll pathway, which is primarily activated after Gram-positive bacterial and fungal infections, controls the expression of Drosomycin, an antifungal peptide,

and many other genes via the NF- κ B family member DIF (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001). The second cascade, known as the IMD pathway, is predominantly triggered after Gram-negative infection and regulates, via the NF- κ B protein Relish, the synthesis of many antibacterial peptides. (Brennan and Anderson, 2004; Hoffmann, 2003). An efficient Toll pathway activation after Gram-positive bacterial infection requires the function of at least three soluble proteins, namely Peptidoglycan Recognition Protein-SA (PGRP-SA) (Michel et al., 2001), PGRP-SD (Bischoff et al., 2004) and Gram-Negative Binding Protein-1 (Gobert et al., 2003; Pili-Floury et al., 2004). On the other hand, sensing of Gram-negative bacterial infection has been shown to be dependent on two other PGRP family members, PGRP-LC (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002) and PGRP-LE (Takehana et al., 2002; Takehana et al., 2004). The ability of *Drosophila* to discriminate between Gram-positive and Gram-negative bacteria relies on the specific recognition of different forms of peptidoglycan (PGN) (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003). Bacterial peptidoglycan consists of long carbohydrate chains of alternating *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid connected via stem peptides (Schleifer and Kandelr, 1972) (Supplemental Figure S1). Most PGNs from Gram-positive bacteria contain L-lysine in the third position of the stem peptide (Lys-PGN) and are recognised by PGRP-SA and PGRP-SD (Bischoff et al., 2004; Gobert et al., 2003; Michel et al., 2001). In PGN of Gram-negative bacteria as in that of Gram-positive Bacilli, the lysine residue is replaced by meso-diaminopimelic acid (m-DAP) (Supplemental Figure S1). This second type of PGNs (DAP-PGN) is sensed by PGRP-LC and PGRP-LE receptors allowing the activation of the IMD pathway (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003; Stenbak et al., 2004; Takehana et al., 2002; Takehana et al., 2004).

PGRPs form a large group of proteins present in insects and mammals (Kang et al., 1998; Liu et al., 2000; Liu et al., 2001; Tydell et al., 2002; Werner et al., 2000; Yoshida et al.,

1996) which have in common a 160 amino-acid domain with striking sequence similarity to N-acetylmuramyl-L-alanine amidases (NAMLAA) (EC3.5.1.28). (Steiner, 2004). These bacterial enzymes hydrolyse the bond formed between the lactyl group in N-acetylmuramic acid and the L-alanine in the stem peptide of peptidoglycan. In some of these molecules, the amidase function is conserved, as documented for *Drosophila* PGRP-SC1 (Mellroth et al., 2003) and PGRP-LB (Kim et al., 2003), and for mouse and human PGRP-L (Gelius et al., 2003; Wang et al., 2003). In others, such as in PGRP-SA, SD, LE or LC, the replacement of a critical cysteine residue within the PGRP domain abolishes this enzymatic function (Mellroth et al., 2003). It is assumed, on the basis of genetic experiments, that PGRPs without amidase activity serve as a recognition receptor for microbial peptidoglycan. However, the *in vivo* function of PGRPs with amidase activity remains unclear and PGRP-L mutant mice show no immune phenotype. On the basis of *in vitro* experiments it has been proposed that PGRP amidase could act as scavenging molecules. Indeed, degradation of PGN by *Drosophila* PGRP-SC1b markedly reduces its immuno-stimulatory potency in cell culture assays (Mellroth et al., 2003). We report here the first *in vivo* study on the role of dPGRPs with amidase activity. We show that by degrading PGN, some amidase PGRPs control the intensity of the *Drosophila* immune response and therefore act as detoxifying enzymes. We also present evidences that in absence of such control, the infection-induced IMD pathway over-activation can cause developmental defects and larval death.

Results and Discussion

In order to address the function of NAMLAA PGRPs under *in vivo* conditions, we have analysed the immune response of *Drosophila* with reduced PGRP-SC1 and PGRP-SC2 levels. The *Drosophila* genome contains a cluster of two tandemly arranged *PGRP-SC1* loci (named a and b) and a single *PGRP-SC2* locus (Werner et al., 2000) (Supplemental Figure S2A). The

two *PGRP-SC1* mRNAs differ by only three nucleotides and translate into a unique protein that is 70% identical to the PGRP-SC2 polypeptide (Supplemental Figure S2B and S2C). Furthermore, PGRP-SC1 and PGRP-SC2 proteins form a separate cluster in the PGRP phylogenetic tree (Supplemental Figure S2D). To eliminate potential problems of functional redundancy between these two homologous enzymes *in vivo*, we decided to simultaneously knock-down *PGRP-SC1* and *PGRP-SC2* gene. The presence of long stretches of identical sequences in their transcript prompted us to take advantage of the RNA interference method (Supplemental Figure S2B). Adult flies carrying a *UAS iPGRP-SC* construct (see Experimental Procedures) together with an ubiquitous *Gal4* driver (*DaGal4*) exhibited a 90% reduction of both *PGRP-SC1* and *PGRP-SC2* mRNA levels (Figure 1A). The transcript levels of *PGRP-SA* and *PGRP-SD*, two closely related family members, were unaffected in these flies, demonstrating the specificity of the *UAS iPGRP-SC* construct (Figure 1A).

We have first analysed the potential role of the PGRP-SC in adult flies which are more amenable than larvae to pricking and survival experiments. For this, we infected *DaGal4;UAS iPGRP-SC* flies with two Gram-negative bacteria (*Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*) and one Gram-positive Bacillus (*Bacillus subtilis*). Strikingly, flies with reduced levels of PGRP-SC over-responded to the infection. As illustrated in Figure 1B, *Diptericin* transcript levels (a conventional readout of the IMD pathway) detected at 24 or 48 hours after infection were significantly higher in *DaGal4;UAS iPGRP-SC* than in *UAS iPGRP-SC* control flies (Figure 1B). This result indicates that depletion of PGRP-SC induces an over-activation of the IMD pathway after bacterial infection. This effect was IMD-pathway specific since Toll-dependent activation of *Drosomycin* by the Gram-positive *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* was similar in *UAS iPGRP-SC* and *DaGal4;UAS iPGRP-SC* flies (Figure 1C). Experiments performed with another ubiquitous *Gal4* driver

(*ActinGal4*) and an independent *UAS iPGRP-SC* insertion, generated identical results (data not shown). The specificity of the effects observed was further substantiated by experiments in which *PGRP-SA* was targeted by dsRNA interference. Whereas *DaGal4;UAS iPGRP-SA* flies show a reduced ability to respond to *Micrococcus luteus*, they respond to *Escherichia coli* remained wild type. Therefore, *DaGal4;UAS iPGRP-SA* flies behave as classical *PGRP-SA* loss-of-function mutants and not as flies with reduced PGRP-SC levels (Supplemental Figure S3).

We were intrigued to note that depletion of PGRP-SC1 and PGRP-SC2 had no effect on the level of activation of the Toll pathway, in contrast to that of the IMD pathway. This observation raised the question whether the amidase activity of PGRP-SC *in vivo* could be specifically directed against DAP-PGN rather than Lys-PGN. It is of note that non-enzymatic PGRPs, such as PGRP-SA, PGRP-LC or PGRP-LE are able to discriminate between two types of PGN (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003; Takehana et al., 2002; Takehana et al., 2004). To address this question in our experimental system, we over-expressed PGRP-SC1b *in vivo* (Supplemental Figure S4). As expected, *UAS PGRP-SC1b* control flies infected with Gram-negative bacteria or Bacilli strongly expressed the *Diptericin* gene. Importantly, this induction was totally suppressed in flies over-expressing PGRP-SC1b (Figure 2A). In parallel experiments, we observed that the Toll pathway activation following infection with Gram-positive bacteria was also noticeably reduced in flies over-expressing PGRP-SC1b. These results were confirmed when highly purified PGN from either *Micrococcus luteus* or *Escherichia coli* were used as elicitors instead of the corresponding bacteria. The impaired ability of flies to produce antimicrobial peptides after bacterial challenge in a PGRP-SC1b over-expressing background was clearly correlated with compromised survivals (Figure 2B). *HspGal4;UAS PGRP-SC1b* flies infected with *Enterococcus faecalis* died as quickly as the

Toll pathway mutant *Dif*². These flies were also highly susceptible to infection by the Gram-negative bacteria *Enterobacter cloacae*. Further substantiating these results, the numbers of live *Escherichia coli* present in infected flies over-expressing PGRP-SC1b were considerably higher than in control flies (Figure 2C). Two major conclusions can be drawn from these experiments : (i) The cleavage activity of PGRP-SC1 is not restricted *in vivo* to DAP-PGN, but also extends to Lys-PGN. The specific effect of PGRP-SC depletion on the IMD pathway activation could therefore reflect functional redundancy between amidases able to cleave Lys-PGN *in vivo*. Alternatively, it could be that the IMD but not the Toll pathway activation level is directly linked to the amount of active PGN. (ii) The active form of PGN in the body cavity of flies is represented by the molecules shed off from bacteria: indeed, as shown in Figure 2, live bacteria in the hemolymph of flies which over-express PGRP-SC1b failed to induce *Diptericin* transcription although they were wild-type as regards the IMD signalling pathway. This leads to propose that only released mucopeptides (and not those integral to the bacterial cell wall underneath the LPS layer) can induce the IMD pathway. This proposal is in agreement with previously reported data showing that LPS is not an inducer of the *Drosophila* immune response and reinforces the idea that PGN is the main, if not the only, inducer of the IMD pathway (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003).

We have next addressed the role of PGRP-SC proteins in larvae. Previous qualitative analysis indicated that *PGRP-SC1* and *PGRP-SC2* genes are transcribed in nearly identical patterns and mostly in the gut cells (Werner et al., 2000). Using quantitative RT-PCR, we confirmed that the larval gut is strongly enriched in *PGRP-SC1* and *SC2* mRNA and represent the main site of PGRP-SC amidase synthesis in the larvae (Figure 3A). In a previously established model of infection by ingestion (Basset et al., 2000), it had been observed that larvae fed with the Gram-negative bacteria *Erwinia carotovora carotovora* induce *Diptericin*

transcription in the fat body. Surprisingly, most of the other Gram-negative bacterial species tested in this assay failed to do so and to date no satisfactory explanation had been forwarded for this discrepancy. We reasoned that the gut PGRP-SC amidases might act to reduce the PGN immunogenic potential of these bacteria, preventing them from activating a systemic immune response. To test this hypothesis, *UAS iPGRP-SC* control larvae and *DaGal4;UAS iPGRP-SC* larvae, which exhibit a strong reduction of *PGRP-SC1* and *PGRP-SC2* mRNA levels in their gut (Figure 3A), were fed with various bacterial species (Figure 3B). We then monitored *Diptericin* expression in whole larvae (Figure 3C). As previously reported (Basset et al., 2000), we found that *Erwinia carotovora carotovora*, but not *Escherichia coli*, was able to activate the IMD pathway in control larvae after ingestion. Strikingly, reducing the PGRP-SC levels in the larval gut induced a strong increase in the expression level of the *Diptericin* mRNA 6 and 24 hours after feeding with *Erwinia carotovora carotovora*, as compared to controls. Under these conditions, *Escherichia coli* now became a good inducer of *Diptericin* expression. This increase in the level of *Diptericin* transcription was totally blocked in a *PGRP-LC* mutant background demonstrating that in this process, the PGRP-SC amidases act upstream of the IMD pathway transmembrane receptor (Figure 3C). As shown above for the immune response in adults, reducing the PGRP-SC levels has no effect on Toll pathway activation in larvae (Figure 3D).

The results presented above are compatible with the hypothesis that an essential role of gut amidases in larvae is to degrade immunogenic PGN from ingested bacteria and to modulate activation of the IMD pathway. To evaluate the consequences resulting from the absence of such an immuno-modulation, we followed the fate of naturally infected wild-type and PGRP-SC depleted larvae. We observed that mortality was nearly three times higher in depleted larvae fed with *Escherichia coli* or *Erwinia carotovora carotovora* than in controls

(Figure 4A). This increase in larval lethality was totally suppressed in a *PGRP-LC* mutant background demonstrating that overactivation of the IMD pathway was indeed the cause of the larval death. Interestingly, a small percentage of the *DaGal4;UAS iPGRP-SC* larvae that pupariated and eclosed as pharate adults presented developmental defects such as wing notching (Figure 4B, 4C and 4D). These phenotypes were never observed in control larvae fed with bacteria. To test if this wing phenotype could be due to increased cell death during larval development, imaginal discs from infected larvae were stained with acridine orange. Wing discs from PGRP-SC depleted, bacteria-fed larvae showed higher levels of cell death than controls larvae with normal level of PGRP-SC (Figure 4E and 4F).

Taken together, the data presented here provide novel insights into the physiological roles of PGRPs in *Drosophila*. They show that in addition to their function as pattern recognition receptors, other PGRP family members can specifically control the level of activation of the IMD signalling pathway by decreasing the immuno-stimulatory potential of PGN. In the absence of this control, infection can lead to developmental defects and larval death by over-activation of the immune pathway. Interestingly, recent reports indicate that other immune-induced molecules can have a harmful effect on fly survival. *Salmonella-tiphymurium* infected flies produce TNF-like cytokine, which has been shown to be damaging not only for the bacteria but also for the host (Brandt et al., 2004). In addition, flies in which the gut catalase level has been experimentally reduced show high mortality rate after ingestion of microbe-contaminated foods. This has been interpreted as an evidence that infection mediated induction of reactive oxygen species (such as H₂O₂) must be tightly balanced to avoid larval lethality (Ha et al., 2005). In this respect, our data indicate that PGRP-SC act as detoxifying enzymes for bacterial peptidoglycan in flies. Similar functions have been

attributed to enzymes which reduce the immunogenic potential of LPS during vertebrate immune response (Munford, 2005).

The results presented here are consistent with previous data showing that over-expression of some components of the IMD pathway is larval lethal. However, the molecular mechanisms by which over-activation of the IMD pathway leads to lethality remain unknown. Several components of the IMD pathway are homologous to mammalian proteins involved in signalling through the TNF receptor, a pathway known to trigger apoptosis (Micheau and Tschopp, 2003). On the other hand, the MAP3 kinase TAK1, which is an essential component of the IMD pathway, has been shown to function both as an I κ B kinase (regulating *Diptericin* expression) and as a JNK kinase (Silverman et al., 2003). It is significant in this context that inappropriate activation of the JNK signalling cascade in the wing disc leads to apoptotic pathway dependent morphological defects (Adachi-Yamada et al., 1999). Further investigations will be needed to clarify the molecular link existing between *Drosophila* IMD pathway and the developmental defects we observed. Finally, it will be of interest to investigate whether some amidases or other peptidoglycan modifying enzymes are involved in modulating bacterial-induced immune response in mammals.

Experimental Procedures

Bacterial Strains and *Drosophila* Mutants

The following microorganisms are used: *E. coli* (1106), *M. luteus* (CIP A270), *E. carotovora carotovora 15* (CFPB 2141), *B. subtilis* (Mo201), *E. cloacae*, *E. faecalis*, *S. aureus* and *E. coli* GFP-Amp^R. The *IKK*^{*key1*}, *Dif*², *PGRP-LC*^{*ΔE*} and *PGRP-SA*^{*sem1*} mutant alleles have been previously described (Bischoff et al., 2004).

Generation of *UAS iPGRP-SC*, *UAS iPGRP-SA* and *UAS PGRP-SC1b* Constructs

The *UAS iPGRP-SC* plasmid was constructed by inserting a 558 bp PCR fragment corresponding to the *PGRP-SC1a* coding sequence flanked by BamHI and NheI sites between the NheI-BamHI sites (sense) and the XbaI-BglII sites (antisense), respectively into the RNAi vector (Naitza et al., 2002); primers were as follows: forward 5'-GGGGGATCCATGGTTTCCAAAGTGGCTCTC-3', reverse 5'-GGGGCTAGCCTAGCCAGACCAGTGGGACCA-3'. The same cloning was done for plasmid *UAS iPGRP-SA* by inserting a 612 bp fragment corresponding to the *PGRP-SA* coding sequence; primers were as follows: forward 5'-GGGGGATCCATGCAGCCGGTTCGATTTCGGA-3', reverse 5'-GGGGCTAGCTCCGATGG AAGTTTATCCACA-3'. For plasmid *UAS PGRP-SC1b*, the wild-type *PGRP-SC1b* cDNA was obtained by PCR using the EST GH07464 (flybase) as a template. This fragment was then subcloned into the pUAST vector. Primers were as follows: forward 5'-GGGGGAATTCATGGTTTCCAAAGTGGCTCT-3', reverse 5'-GGGGTCTAGACTCTA ACCAGACCAGTGG-3'. After sequencing, the constructs were injected into *w*¹¹¹⁸ embryos.

Preparation and Injection of Highly Purified *E. coli* and *M. luteus* Peptidoglycan

Highly purified PGN solutions were prepared (Travassos et al., 2004). PGN solution at 5mg/ml was sonicated for 15 min and centrifuged 10min at 10000g. 13.8 nL of this solution was injected into the thorax of 4 day old-females with a Nanoject apparatus (Drummond, Broomall, PA).

Natural Infection of Larvae

Wandering third-instar larvae were placed in a tube containing a mixture of a concentrated overnight bacterial culture with 5 % sucrose and incubated for 30 min at 25°C. For controls, larvae were incubated in Luria-Bertani broth supplemented by 5% sucrose. Larvae were then transferred to grape juice plates and incubated at 25°C. Larvae were monitored for *Diptericin* transcription by Real-Time Q-PCR 6 and 24h after infection. For developmental defects observation, larvae were transferred to standard cornmeal-agar medium and placed at 25°C until hatching.

Quantitative Real-Time PCR

Real-Time Q-PCR was performed as described (Bischoff et al., 2004). Primers were as follows: *PGRP-SC1*, forward 5'-AAGCGATCGTCAACTATTAC AGC-3', reverse 5'-GAGAGCCA CTTTGGAAACCA-3' ; *PGRP-SC1b* (for overexpression checking), forward 5'-AGCT TCCTGGGCAACTACAA-3', reverse 5'-GAGATCATGTTCCGGCTCCAG-3'; *PGRP-SC2*, forward 5'-TGACCATCATCTCCAAGTCG-3', reverse 5'-CAGCGAGGTCTTGCTCGT-3' ; *PGRP-SA*, forward 5'-GCTTCGTTGGGACTCCACTA-3' ; reverse 5'-CGTGTGATGGATG ACCACAT-3' *RpL32*, *Diptericin*, *Drosomycin* and *PGRP-SD* primers are described in (Bischoff et al., 2004; Gottar et al., 2002).

Septic Injuries and Survival Experiments

They were done as previously described (Bischoff et al., 2004).

Acridine Orange Staining

Imaginal discs were dissected in PBS, incubated in 5µg/mL AO solution for 1 minute, rinsed 3 times for 5 minutes in fresh PBS, and mounted in glycerol.

Acknowledgments

We would like to thank Sebahat Ozkan for excellent technical work and Marie Meister for comments on the manuscript. Help of Laurent Troxler and Charles Hetru with sequence alignment is appreciated. This work was supported by CNRS, the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (ACI jeunes Chercheurs and IUF to J.R.) Financial support from the NIH is acknowledged.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.R.

(J.Royet@ibdm.univ-mrs.fr)

References

- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y., and Matsumoto, K. (1999). Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* *400*, 166-169.
- Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Bocard, F., Hoffmann, J. A., and Lemaitre, B. (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3376-3381.
- 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.
- Brennan, C. A., and Anderson, K. V. (2004). *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol* *22*, 457-483.
- Bulet, P., Charlet, M., and Hetru, C. (2002). Antimicrobial peptides in insect immunity. In *Infectious disease: innate immunity*, R. A. B. E. a. J. A. Hoffmann, ed. (Totowa, NJ, Human Press Inc), pp. 89-107.
- 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.
- 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.
- Gelius, E., Persson, C., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* *306*, 988-994.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* *302*, 2126-2130.

- Gottar, M., Gobert, V., 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.
- Ha, E. M., Oh, C. T., Ryu, J. H., Bae, Y. S., Kang, S. W., Jang, I. H., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2005). An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev Cell* *8*, 125-132.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* *426*, 33-38.
- 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.
- Kaneko, T., Goldman, W. E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N. (2004). Monomeric and Polymeric Gram-Negative Peptidoglycan but Not Purified LPS Stimulate the *Drosophila* IMD Pathway. *Immunity* *20*, 637-649.
- 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.
- Kim, M. S., Byun, M., and Oh, B. H. (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat Immunol* *4*, 787-793.
- 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.
- Liu, C., Gelius, E., Liu, G., Steiner, H., and Dziarski, R. (2000). Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. *J Biol Chem* *275*, 24490-24499.
- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001). Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* *276*, 34686-34694.
- Mellroth, P., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem* *278*, 7059-7064.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.
- 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.
- Munford, R. S. (2005). Detoxifying endotoxin: time, place and person. *J Endotoxin Res* *11*, 69-84.
- 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.
- 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*.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* *416*, 644-648.
- Schleifer, K., and Kandelr, P. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* *36*, 407-477.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., and Maniatis, T. (2003). Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J Biol Chem* *278*, 48928-48934.
- Steiner, H. (2004). Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol Rev* *198*, 83-96.
- Stenbak, C. R., Ryu, J. H., Leulier, F., Pili-Floury, S., Parquet, C., Herve, M., Chaput, C., Boneca, I. G., Lee, W. J., Lemaitre, B., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J Immunol* *173*, 7339-7348.
- 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.
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C., and Boneca, I. G. (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* *5*, 1000-1006.
- Tydell, C. C., Yount, N., Tran, D., Yuan, J., and Selsted, M. E. (2002). Isolation, characterization, and antimicrobial properties of bovine oligosaccharide-binding protein. A microbicidal granule protein of eosinophils and neutrophils. *J Biol Chem* *277*, 19658-19664.
- Wang, Z. M., Li, X., Cocklin, R. R., Wang, M., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Gupta, D., and Dziarski, R. (2003). Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J Biol Chem* *278*, 49044-49052.
- 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.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* *415*, 389-395.

Figure Legends

Figure 1. PGRP-SC NAMLAAs Downregulate Bacterially Induced IMD Pathway Activation

(A) mRNA level quantification of different PGRPs (*PGRP/RpL32*) shows that *PGRP-SC1* and *PGRP-SC2* mRNA levels are severely reduced in *DaGal4;UAS iPGRP-SC* flies compared to *UAS iPGRP-SC* control flies. *PGRP-SA* and *PGRP-SD* mRNA levels are not affected.

(B) kinetics of *Diptericin* mRNA induction (*Dipt/RpL32*) after infection by various bacteria.

(C) kinetics of *Drosomycin* mRNA induction (*Drs/RpL32*) after infection by Gram-positive bacteria. Each histogram corresponds to the mean value of 5 (for A) and 6 (for B and C) independent experiments (\pm s.d). \square indicates that the difference between *DaGal4;UAS iPGRP-SC* and control *UAS iPGRP-SC* values is statistically significant ($P < 0.05$). *RpL32* is used as an internal control.

Figure 2. PGRP-SC1b Cleavage Specificity Is Not Restricted to DAP-type PGN *In Vivo*.

(A) *Diptericin* and *Drosomycin* mRNA levels measured respectively 6h and 24h after infection show that activation of both the IMD and the Toll pathways are affected by PGRP-SC1b overexpression. Highly purified *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* PGN were injected. Each histogram corresponds to the mean value of 6 independent experiments (\pm s.d).

(B) survival rates of flies with normal or increased PGRP-SC levels infected with either Gram-negative or Gram-positive bacteria.

(C) bacterial growth 24h after infection by *Escherichia coli* expressed as colony-forming units (CFU) per fly. Each histogram corresponds to the mean value of 4 independent experiments (\pm s.d.). \square indicates that the difference between *HspGal4; UAS PGRP-SC1b* and control *UAS PGRP-SC1b* values is statistically significant ($P < 0.05$). HS, heat-shocked; NHS, non heat-

shocked; ci, clean injury. *IKK^{key1}* and *Dif²* are loss-of-function mutants of components of the IMD and the Toll pathways respectively.

Figure 3. Reduction of Larval PGRP-SC Levels Increases IMD Pathway Activation After Natural Infection in a *PGRP-LC* Dependent Manner.

(A) *PGRP-SC1* and *PGRP-SC2* mRNA (*PGRP-SC/RpL32*) are mainly expressed in larval gut and severely reduced in *DaGal4;UAS iPGRP-SC* larvae. Each histogram corresponds to the mean value of 4 independent experiments (\pm s.d.).

(B) Three hours after natural infection with *Escherichia coli*-GFP, bacteria were found highly concentrated in the anterior half of the larval gut.

(C) *Diptericin* mRNA induction levels (*Dipt/RpL32*), measured 6h and 24h after natural infection. Each histogram corresponds to the mean value of variable number (n) of independent experiments (\pm s.d.). \square indicates that the difference between *DaGal4;UAS iPGRP-SC* and control *UAS iPGRP-SC* values is statistically significant ($P < 0.05$).

(D) *Drosomycin* mRNA induction levels (*Drs/RpL32*), measured 24h after natural infection. Each histogram corresponds to the mean value of 4 independent experiments (\pm s.d.).

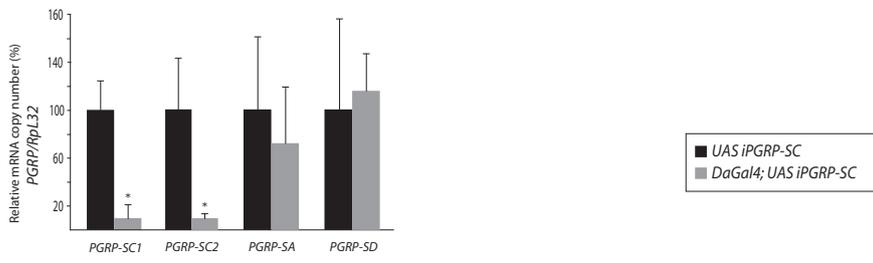
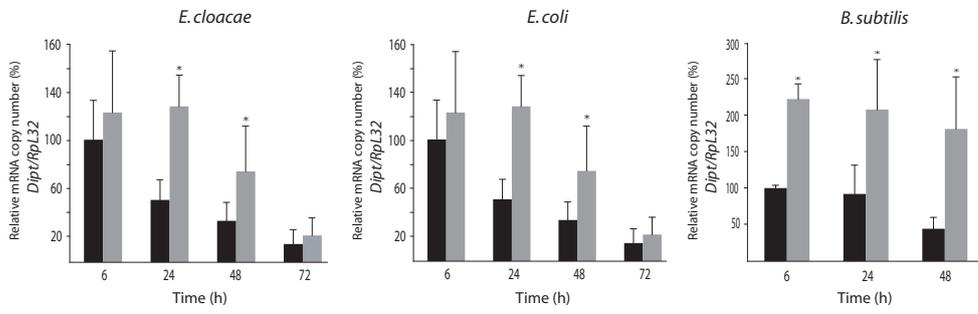
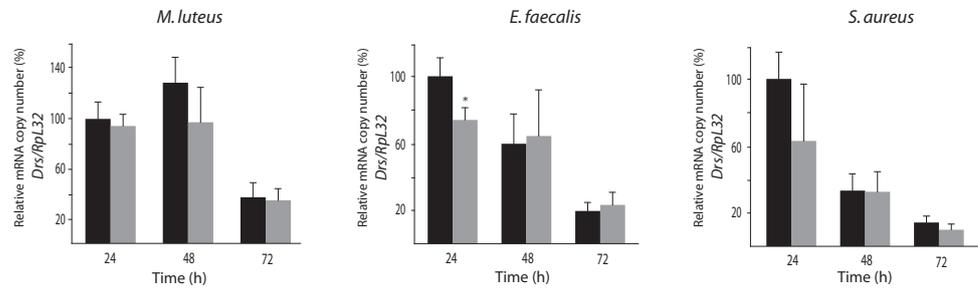
Figure 4. Reduction of PGRP-SC Levels Sensitizes Larvae to Bacterial Infection.

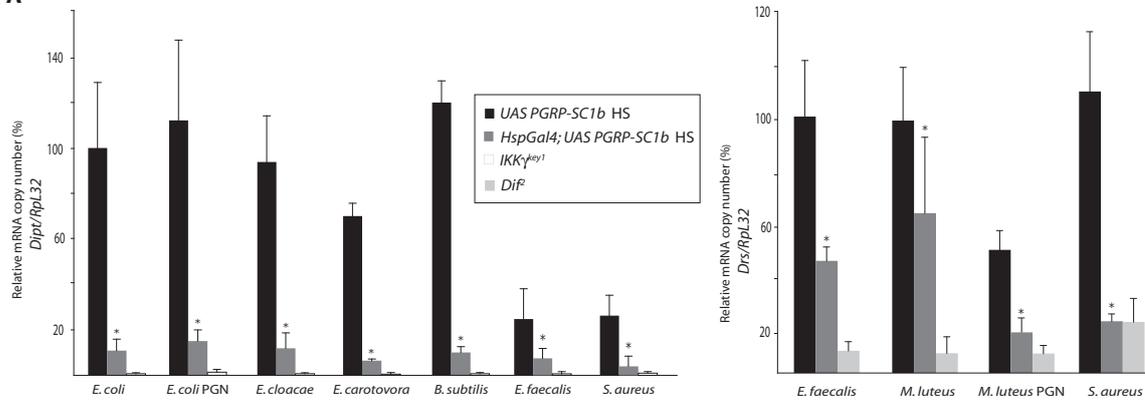
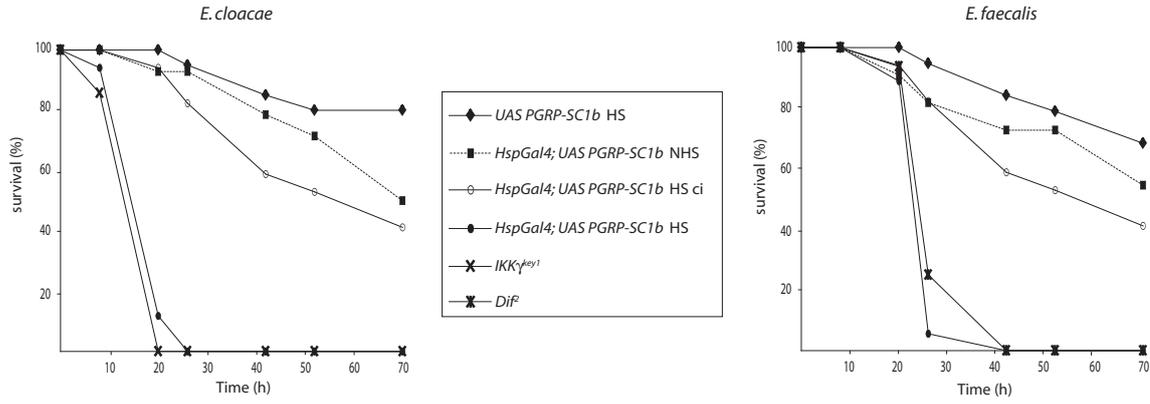
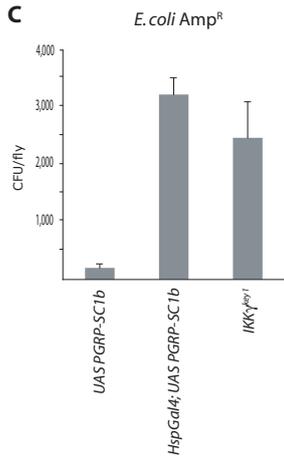
(A) The percentage of larval death is measured 24h after natural infection. (n) corresponds to the total number of infected larvae.

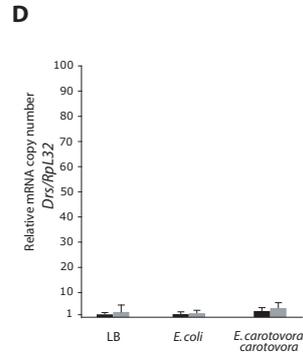
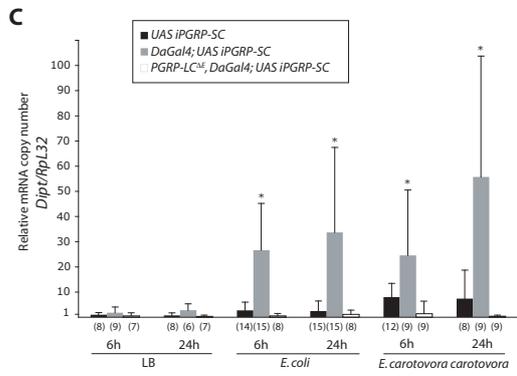
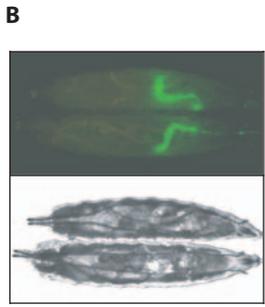
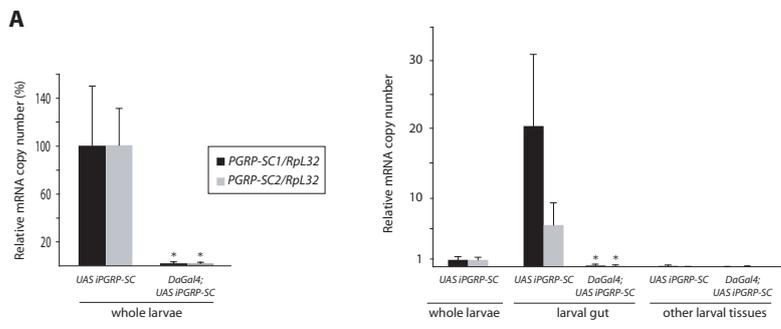
(B) The percentage of adults showing wing notching is measured 7 days after natural infection. (n) corresponds to the total number of infected larvae.

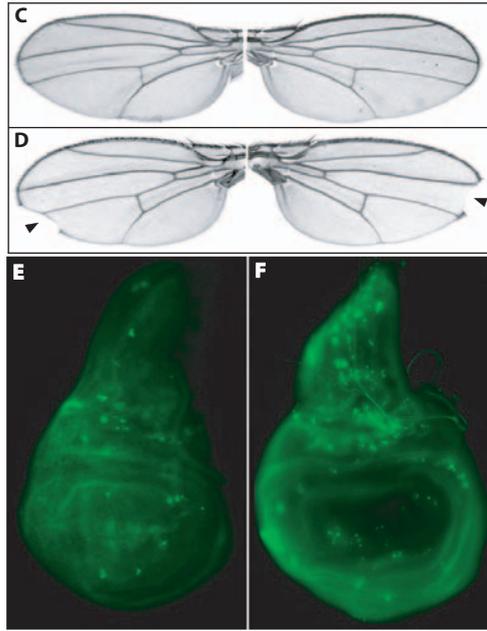
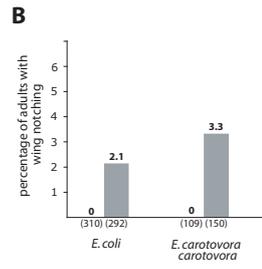
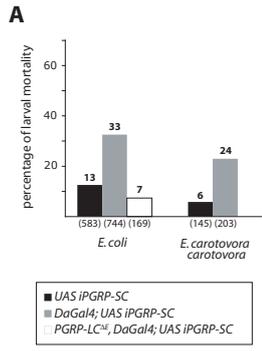
(C-F) Natural infections with *Erwinia carotovora carotovora* and *Escherichia coli* trigger increased cell death and developmental defects in *DaGal4;UAS iPGRP-SC* flies. Wing

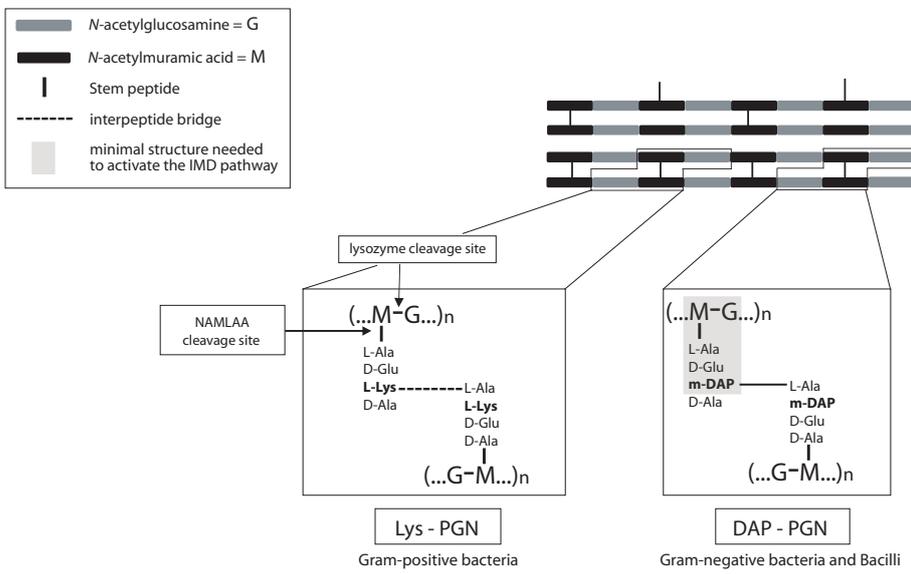
imaginal discs dissected from *DaGal4;UAS iPGRP-SC* larvae (F) show higher levels of cell death after natural infection than discs from *UAS iPGRP-SC* control larvae (E). Consistently, some *DaGal4;UAS iPGRP-SC* adults derived from infected larvae have wing notching (arrowheads) (D), which are never observed in infected controls (C).

A**B****C**

A**B****C**

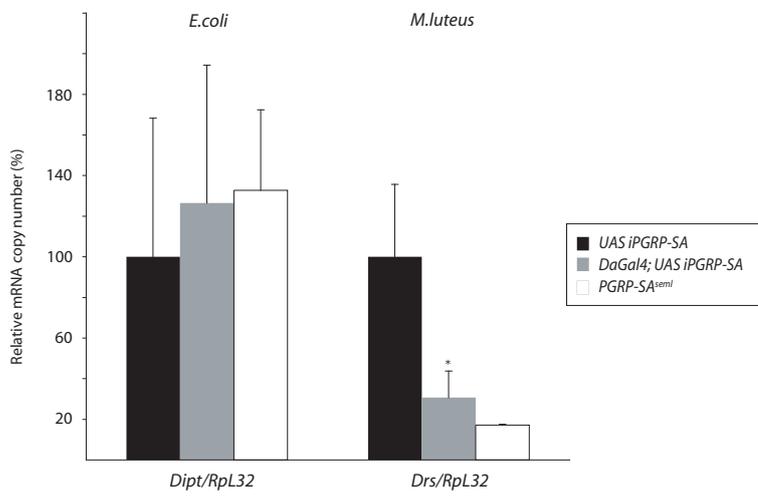






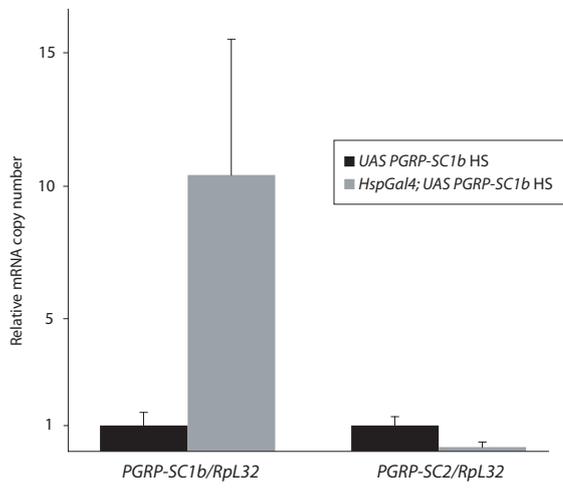
Supplemental Figure S1 . Schematic Representation of the Peptidoglycan Structure.

Peptidoglycan (PGN) is a polymer of alternating *N*-acetylmuramic acid (M) and *N*-acetylglucosamine (G) linked by stem peptide bridges. Gram-positive bacteria have a Lysine at the third position of this bridge (Lys-PGN) whereas Gram-negative bacteria and Bacilli have a meso-diaminopimelic acid (m-DAP) at this position (DAP-PGN). The stem peptides of DAP-PGN are generally directly cross-linked whereas those of Lys-PGN are usually cross-linked through an "interpeptide bridge" that varies in length and amino acid composition according to the Gram-positive bacteria species. The minimal structure required to activate the IMD signaling pathway consists in two sugars and the three first amino acids of the stem peptide²³.



Supplemental Figure S3 . DaGal4; UAS iPGRP-SA Flies Do Not Over-activate the IMD Pathway after Bacterial Infection.

Quantification of *Diptericin* mRNA levels in *UAS-iPGRP-SA*, *DaGal4; UAS-iPGRP-SA* and *PGRP-SA^{semi}* flies shows that reduction of *PGRP-SA* mRNA levels does not influence IMD pathway induction after *E. coli* infection. Quantification of *Drosomycin* mRNA levels after *M. luteus* infection indicates that *PGRP-SA* is efficiently knocked down by dsRNA interference. *PGRP-SA^{semi}* is a complete loss-of-function mutant for *PGRP-SA*. Each histogram corresponds to the mean value of 5 independent experiments (\pm s.d). * indicates that the difference between *DaGal4; UAS iPGRP-SA* and control *UAS iPGRP-SA* values is statistically significant ($P < 0.05$).



Supplementary Figure S4 . Quantification of PGRP-SC1b and PGRP-SC2 Transcripts. It indicates that the PGRP-SC1 over-expression is effective in *HspGal4; UAS PGRP-SC1b* flies 1h after a 30 minutes heat-shock (37°C) treatment (HS). The measurement of *PGRP-SC2* mRNA in these flies shows that *PGRP-SC2* primers used for amplification are able to discriminate between *PGRP-SC2* and *PGRP-SC1b* transcripts. Each histogram corresponds to the mean value of 4 independent experiments (\pm s.d).

C. Expériences complémentaires

Pour tester si le phénotype de suppression de l'activation de la voie IMD après infection par les bactéries à Gram-négatif lors de la surexpression de PGRP-SC1 provient de l'activité amidase de cette protéine, nous avons réalisé la même expérience en utilisant une version de PGRP-SC1 mutée dans son site catalytique. Nous observons que cette version enzymatiquement inactive conduit au même effet que la version sauvage de PGRP-SC1 (figure 19). Une explication possible pour ce résultat serait un effet de titration du ligand par la grande quantité d'amidase mutée exprimée. Cette hypothèse est en accord avec les données obtenues *in vitro* qui montrent que cette version mutée a perdu son activité enzymatique mais qu'elle a conservé la capacité de lier le PGN (Mellroth et al., 2003). Dans ce cas, les molécules PGRP-SC1 exprimées en grande quantité séquestreeraient le PGN empêchant sa fixation sur PGRP-LC. Nous ne pouvons pas à ce niveau conclure que l'activité amidase de PGRP-SC1 est responsable du phénotype observé. Cependant, l'activité enzymatique de cette protéine ayant été démontrée *in vitro*, il est fortement possible que ce soit également le cas *in vivo*.

L'expression des PGRP-SC étant majoritaire dans l'intestin, nous avons testé l'effet de sa réduction spécifiquement dans ce tissu en utilisant le driver CaudalGal4. L'utilisation de ce driver conduit à une diminution importante de l'expression des ARNm de PGRP-SC1 et PGRP-SC2 dans l'intestin (figure 20 A). Nous observons que l'inactivation des PGRP-SC dans l'intestin larvaire se traduit par une forte activation de l'expression de la *Diptéricine* après infection naturelle par *E. coli* et *E. carotovora carotovora* (figure 20 B). L'utilisation d'un gène rapporteur *Dipt LacZ* indique que plus de 40% des larves déplétées pour les amidases PGRP-SC présentent une activation de la voie IMD après infection par *E. coli* (figure 20 C), en condition sauvage, cette bactérie n'est capable d'induire la synthèse de la *Diptéricine* que dans 5% des larves. Nous montrons également que la surexpression de PGRP-SC1 spécifiquement dans l'intestin est suffisante pour bloquer l'activation de la voie IMD après infection naturelle par *E. carotovora carotovora* (figure 20 D). Ces résultats nous permettent d'affirmer que l'action des PGRP-SC se situe au niveau de l'intestin.

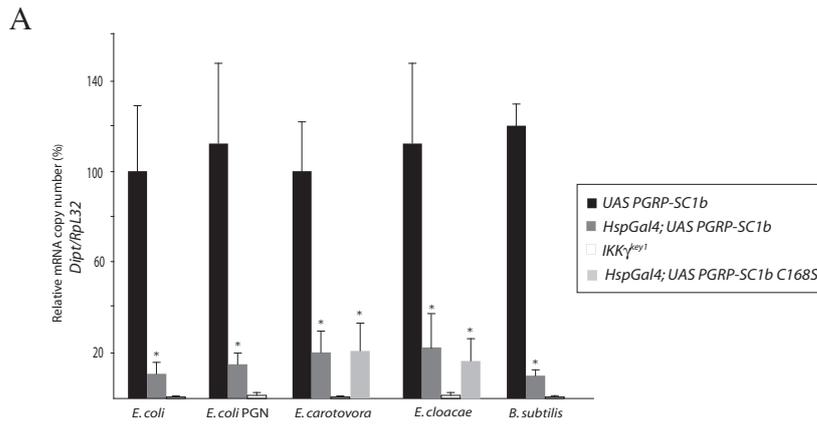


Figure 19 : Surexpression de la version mutée de PGRP-SC1

La quantification de la *Diptéricine* montre que la surexpression de la forme sauvage et de la version mutée de PGRP-SC1 (C1686) affecte l'activation de la voie IMD après infection ou injection du PGN d'*E. coli*.

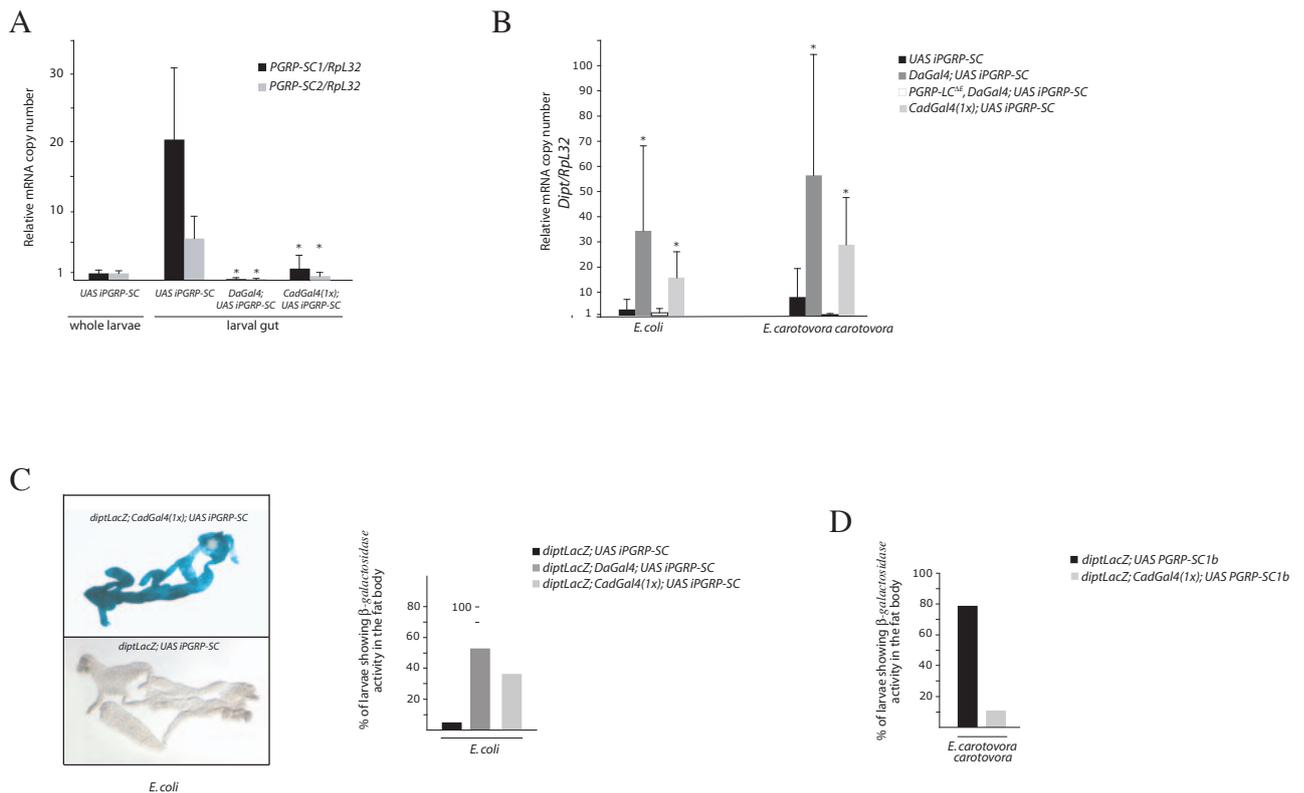


Figure 20 : La réduction de l'expression des PGRP-SC dans l'intestin augmente l'activation de la voie IMD après infection naturelle

- A. Les transcrits de PGRP-SC1 et -SC2 sont fortement réduits dans l'intestin des larves CadGal4;UAS iPGRP-SC.
- B. Quantification de la *Diptéricine* 24 h après infection naturelle par *E. coli* et *E. carotovora carotovora*
- C. La réduction des PGRP-SCs dans l'intestin des larves est suffisante pour induire l'expression de la *Diptéricine* dans le corps gras après infection naturelle par *E. coli*.
- D. La surexpression de PGRP-SC1 dans l'intestin bloque l'activation de la *Diptéricine* dans le corps gras après infection naturelle par *E. carotovora carotovora*.

D. Conclusions et discussion

Nous avons démontré dans cet article l'importance du contrôle de l'activation de la réponse immunitaire de la drosophile et le rôle des amidases dans ce processus. Chez l'adulte, la déplétion des amidases PGRP-SC induit une hyper-activation spécifique de la voie IMD après infection par des bactéries à Gram-négatif. La différence de phénotype observée entre les voies Toll et IMD ne provient pas d'une coupure préférentielle des amidases PGRP-SC envers le peptidoglycane de type Lysine puisque la surexpression de ces enzymes réduit également l'expression de la Drosomycine après infection par des bactéries à Gram-positif. Cependant, le blocage de la voie Toll est moins important que pour la voie IMD. Cette différence pourrait s'expliquer par une redondance des amidases capables de cliver le PGN de type lysine. Une autre explication pourrait provenir du mode d'activation de la voie Toll par rapport à la voie IMD. En effet, la voie Toll est activée par le clivage de Spätzle qui résulte d'une cascade protéolytique activée par la reconnaissance des bactéries par PGRP-SA et GNBP-1 alors que l'activation de la voie IMD est directement fonction de la quantité de ligand qui va se fixer sur PGRP-LC.

1. La reconnaissance du PGN

La quantification de la croissance bactérienne après infection dans les drosophiles qui surexpriment les PGRP-SCs a donné un résultat surprenant et nous permet d'avancer plusieurs hypothèses concernant les molécules qui activent la voie IMD. Comme nous l'observons, dans des drosophiles sauvages, l'infection bactérienne est maîtrisée et les bactéries sont éliminées. En contexte mutant *key* (mutant du signalosome de la voie IMD), les drosophiles ne synthétisent pas de peptides antimicrobiens, elles ne sont pas capables d'éliminer les bactéries qui alors se multiplient. De manière intéressante, dans les drosophiles qui surexpriment les amidases PGRP-SC, les bactéries se multiplient comme dans le mutant *key*. Cependant, ces bactéries n'activent pas la synthèse de la *Diptéricine* alors que ces drosophiles ont une cascade de signalisation IMD sauvage.

Nous proposons que lors d'une infection par des bactéries à Gram-négatif, la molécule qui active la réponse immunitaire est le PGN relargué par les bactéries, probablement lors du renouvellement de sa paroi. La structure minimale de PGN capable d'activer la voie IMD est composée d'une *N*-acétylglucosamine liée à un acide *N*-acétylmuramique rattaché aux trois premiers acides aminés du pont peptidique (voir figure 9) (Stenbak et al., 2004). La coupure par PGRP-SC1b détache la chaîne de glycane du pont peptidique, les fragments ainsi générés ne possèdent plus le motif reconnu par PGRP-LC, et par conséquent ne sont plus capables d'activer la réponse immunitaire. En contexte sauvage, les PGRP-SC n'hydrolyseraient qu'une fraction des PGN produits, laissant des molécules accessibles pour les récepteurs. Le rôle de ces PGRPs est ainsi de contrôler l'activation de la voie IMD. Dans un contexte de surexpression de PGRP-SC, ces amidases clivent tout le PGN contenu dans l'hémolymphe, ce qui explique l'absence d'induction de la *Diptéricine*. D'autre part, la grande quantité de bactéries présentes dans l'hémolymphe et incapables d'activer la voie IMD indique que le PGN est le seul inducteur de la réponse immunitaire. Enfin, nous observons que la surexpression de PGRP-SC1b n'a pas d'influence sur la croissance des bactéries, ce qui indique que cette molécule ne présente pas d'activité antibactérienne.

2. Rôle de l'intestin dans la surveillance immunitaire

L'activation de la voie IMD et la synthèse des peptides antimicrobiens par le corps gras sont essentiels pour assurer la survie des drosophiles lors d'une infection par piqûre septique. Cette observation provient essentiellement des phénotypes de survie obtenus lors de l'infection des mutants de la voie IMD. Cependant, ceci n'est plus vrai si on se place dans un système d'infection naturelle. En effet, peu de souches bactériennes sont capables d'infecter la drosophile par voie naturelle, c'est-à-dire d'activer la synthèse des AMPs dans le corps gras lors d'une telle infection (Basset et al., 2000). Les bactéries ingérées sont contenues dans l'appareil digestif de la larve et y persistent pendant plusieurs heures. En condition sauvage, *Escherichia coli* (*Ec*) contrairement à *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc*) n'est pas capable d'induire une réponse systémique lors d'une infection naturelle (Basset et al., 2000). Un gène de virulence (*evf*) a été mis en évidence dans le génome de *Ecc* qui serait à l'origine de l'activation de la réponse systémique (Basset et al., 2003). En effet, l'expression de ce gène par des bactéries qui n'induisent pas de réponse, telles que *Ec*, leur suffit pour activer

l'expression des AMPs. Il semblerait que ce gène permette aux bactéries de traverser la barrière épithéliale, probablement par la déstabilisation de la membrane péritrophique, pour activer la réponse systémique. Cependant, le passage des bactéries dans l'hémolymphe reste encore hypothétique puisque les bactéries n'y sont retrouvées que dans de rares cas.

Nous montrons dans cet article que les amidases PGRP-SC, majoritairement exprimées dans l'intestin, jouent un rôle important dans le contrôle de l'activation de la réponse immunitaire par les bactéries lors d'une ingestion. En effet, les larves déplétées pour ces amidases infectées par voie naturelle par *Ec* deviennent capables d'activer la réponse systémique. Cette réponse systémique est plus forte que chez les larves sauvages lors de l'infection par *Ecc*, naturellement capables d'activer la synthèse de la *Diptéricine* dans le corps gras dans ces conditions.

Le rôle de ces amidases PGRP-SC, présentes dans l'intestin, serait de dégrader le PGN lors d'une infection pour éviter une activation trop importante de la réponse immunitaire. Suivant notre modèle, nous pouvons proposer que, par rapport à *Ec*, *Ecc* libérerait beaucoup de PGN qui ne serait pas totalement dégradé par les amidases PGRP-SCs et qui pourrait diffuser à travers la barrière épithéliale pour activer la réponse immunitaire. Notre hypothèse n'est pas exclusive et peut compléter le rôle du gène de virulence *evf* présent chez *Ecc*.

Nous avons observé que les larves qui présentent un taux réduit en amidases PGRP-SC sont susceptibles aux infections naturelles par *Ec* et *Ecc* en comparaison avec les larves contrôles. Cette létalité est supprimée dans un mutant *PGRP-LC* ce qui indique que la mortalité est due à l'hyperactivation de la voie IMD. Après infection, nous avons laissé les larves se développer et éclore et nous avons remarqué que certains adultes déplétés en PGRP-SC présentent une indentation de l'aile qui traduit un problème au cours du développement. Un marquage à l'acridine orange des disques imaginaux d'ailes de larves infectées indique que ce défaut dans l'aile adulte est dû à une augmentation de la mort cellulaire dans le disque au cours du développement.

Nous montrons que l'activation inappropriée de la voie IMD peut être nocive pour la drosophile. La drosophile a mis en place un système de contrôle élaboré qui consiste à empêcher l'activation de la réponse immunitaire en dégradant le PGN. En effet, le mode de vie de la drosophile, par exemple le développement des larves sur des fruits en décomposition et leur consommation, la confronte à une grande variété de bactéries contre lesquelles elle doit se protéger. La plupart des bactéries rencontrées par la drosophile ne déclenchent pas de réponse systémique et il semblerait que d'autres mécanismes interviennent pour éviter la nuisance de ces bactéries. La présence des amidases au niveau de l'intestin pourrait être un de ces mécanismes, tout comme l'expression constitutive des AMPs dans les épithélia, la présence de lysozyme dans l'intestin, la structure de la membrane péritrophique et le pH acide de l'intestin.

D'autres molécules produites au cours de la réponse immunitaire sont nuisibles pour la drosophile. Les radicaux libres de l'oxygène (NO, H₂O₂,) interviennent dans l'élimination des bactéries lors d'une infection. Cependant, ces composés doivent être rapidement éliminés parce qu'ils ont un effet toxique (Bogdan, 2001). Le succès de la réponse faisant intervenir ces réactifs oxygénés repose sur une fine balance entre leur production en quantité suffisante pour combattre l'infection et leur élimination pour éviter les dommages à l'hôte. Chez la drosophile, l'interaction hôte/microbe induit la synthèse de ces composés et une étude a montré que l'oxyde nitrique est impliqué dans le déclenchement de l'immunité lors d'une infection par des bactéries à Gram-négatif (Foley and O'Farrell, 2003; Ha et al., 2005). Chez la drosophile, l'élimination de ces intermédiaires toxiques fait intervenir une catalase présente dans l'intestin. La diminution de l'expression de cette enzyme par interférence à ARN conduit à la mort des drosophiles à cause d'un choc oxydatif (Ha et al., 2005).

Dans notre étude, la régulation s'effectue en amont par les PGRP-SCs qui régulent la quantité de PGN capable d'activer la voie IMD. Ainsi, les fragments issus de la digestion du PGN ne sont plus reconnus par PGRP-LC et les mucopeptides non coupés activent la voie IMD suffisamment pour éliminer les pathogènes. Chez les mammifères, pour éviter une réponse trop importante au LPS qui peut conduire au choc septique, il existe des mécanismes de détoxification du LPS. Ces mécanismes consistent par exemple, à séquestrer l'endotoxine dans la circulation pour empêcher sa fixation aux récepteurs, ou à altérer le motif du LPS

reconnu (Munford, 2005). De la même manière, les PGRP-SC agiraient comme des enzymes de détoxification du PGN.

E. Perspectives

Nos résultats indiquent qu'une activation inappropriée de la voie IMD est létale pour les larves. Cependant, les mécanismes conduisant à cette létalité demeurent inconnus. La kinase TAK1 qui intervient dans l'activation du signalosome dans la voie IMD est également impliquée dans la voie JNK qui joue un rôle important dans les processus d'apoptose. Il serait par la suite intéressant de tester si les phénotypes observés chez les larves proviennent d'une activation inappropriée de cette voie.

CHAPITRE III

Régulation négative de la voie IMD par PGRP-LF

III. Régulation négative de la voie IMD par PGRP-LF

A. Introduction

Au cours de l'étude structure-fonction sur le récepteur PGRP-LC, nous avons mis en évidence l'effet dominant négatif d'une construction qui possédait le domaine transmembranaire et la partie extracellulaire de cette protéine. La structure de PGRP-LF, un autre membre de la famille des PGRPs, est similaire à cette construction. En effet, PGRP-LF est formée par deux domaines PGRP et un domaine transmembranaire sans partie intracytoplasmique (voir figure 7 et figure 21). De plus, les domaines PGRPs de PGRP-LC et PGRP-LF sont phylogénétiquement très proches. Ces observations nous ont conduit à penser que PGRP-LF pourrait être un candidat pour le contrôle de l'activation de la voie IMD. PGRP-LF pourrait jouer le même rôle que les récepteurs DcR chez les mammifères qui modulent l'apoptose induite par les récepteurs du TNF en séquestrant le ligand (Ashkenazi and Dixit, 1999).

B. Résultats

En l'absence d'un mutant perte-de-fonction disponible, nous avons décidé d'utiliser la technique de l'interférence à l'ARN pour diminuer la quantité de PGRP-LF *in vivo*. Nous avons généré des drosophiles exprimant un ARN double brin pour induire la dégradation spécifique de l'ARN messager endogène de PGRP-LF. Nous avons confirmé par western blot une diminution de la protéine chez les drosophiles qui surexpriment l'ARN double brin de PGRP-LF (figure 22).

1. PGRP-LF est un régulateur négatif des voies de signalisation IMD et JNK de la drosophile

Chez la drosophile, la voie IMD contrôle l'expression de la *Diptéricine* au niveau du corps gras lors d'une piqûre septique mais également la production de la drosomycine au niveau des épithélia lors d'une infection naturelle chez les larves.

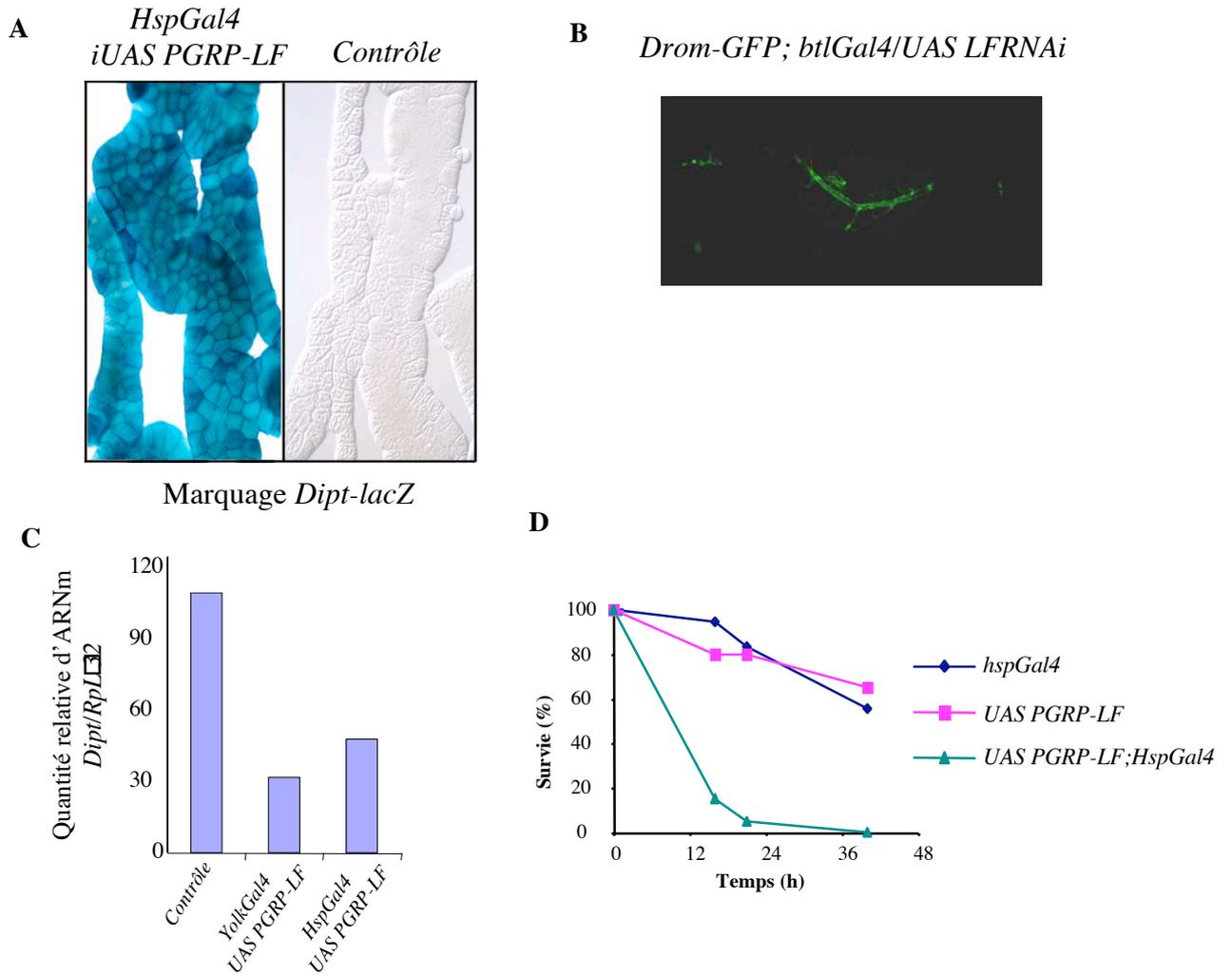


Figure 23 : PGRP-LF est un régulateur négatif de la voie IMD

La diminution de l'expression de PGRP-LF induit une activation constitutive de la synthèse de la *Diptéricine* dans le corps gras larvaire (A) et l'expression de la *Drosomyecine* dans les trachées chez la larve (B). La surexpression de PGRP-LF bloque la synthèse de la *Diptéricine* après infection par *E. cloacae* (C) et rend les drosophiles susceptibles à l'infection (D).

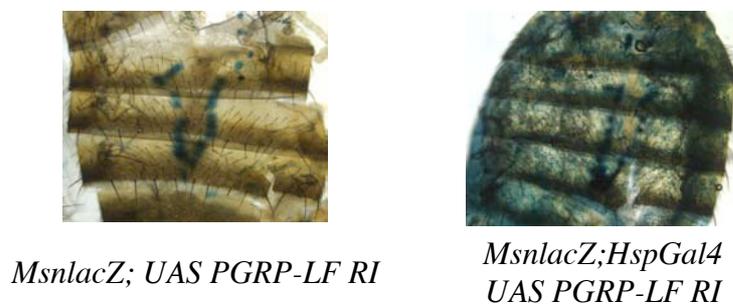


Figure 24 : PGRP-LF est un régulateur négatif de la voie JNK

La diminution de l'expression de PGRP-LF induit l'expression constitutive de *msn*, une cible de la voie JNK dans le corps gras de la drosophile adulte.

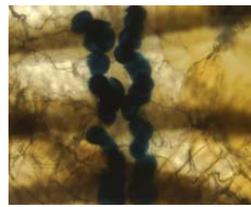
Avec l'idée que PGRP-LF pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la voie IMD, nous avons tout d'abord regardé l'effet de la diminution de cette protéine sur la synthèse des peptides antimicrobiens en absence d'infection. Nous avons observé que la diminution de PGRP-LF induit de manière constitutive l'expression de la *Diptéricine* dans le corps gras et de la drosomycine dans les trachées larvaires (figure 23 A et B). Il semblerait donc que PGRP-LF soit un régulateur négatif de la voie IMD au niveau des réponses systémiques et locales. En accord avec ce rôle de PGRP-LF dans le contrôle de l'activation de la voie IMD, nous montrons que la surexpression de PGRP-LF, d'une part, bloque la synthèse des peptides antimicrobiens après infection par les bactéries à Gram-négatif *Escherichia coli* et *Enterococcus cloacae*, et d'autre part rend les drosophiles plus sensibles à l'infection (figure 23 C et D).

La voie IMD possédant un branchement en aval de la kinase TAK vers la voie JNK, nous avons regardé l'effet de l'inactivation de PGRP-LF sur cette voie de signalisation. Nous observons, dans une expérience préliminaire, que la diminution de PGRP-LF conduit à une activation constitutive de la voie JNK (figure 24) PGRP-LF semble donc également être un régulateur négatif de la voie JNK.

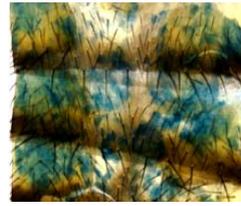
Etant donné le rôle joué par ces deux voies de signalisation (IMD et JNK) dans la mort cellulaire, nous avons voulu savoir si la fonction de PGRP-LF pouvait être en relation avec l'apoptose. Nous avons observé que la diminution de PGRP-LF induisait l'expression du gène *reaper* dans le corps gras des drosophiles (figure 25). Il semblerait que PGRP-LF joue un rôle dans la répression des mécanismes effecteurs de l'apoptose.

L'ensemble des données que nous avons actuellement concernant PGRP-LF confère à cette protéine un rôle dans la régulation négative des voies de signalisation IMD et JNK chez la drosophile.

Par la suite, nous avons réalisé des expériences d'épistasie pour situer l'action de PGRP-LF dans la voie IMD. Nous avons effectué des épistasies avec PGRP-LC et plusieurs membres intracytoplasmiques de la voie IMD (*key*, *dredd* et *Tak*). Nous avons observé que la



Rpr LacZ; yolkGal4



*Rpr LacZ; yolkGal4
UAS PGRP-LF RNAi*

Figure 25 : PGRP-LF possède une fonction en relation avec l'apoptose

La diminution de l'expression de PGRP-LF induit l'expression constitutive de *rpr*, un effecteur de l'apoptose dans le corps gras.

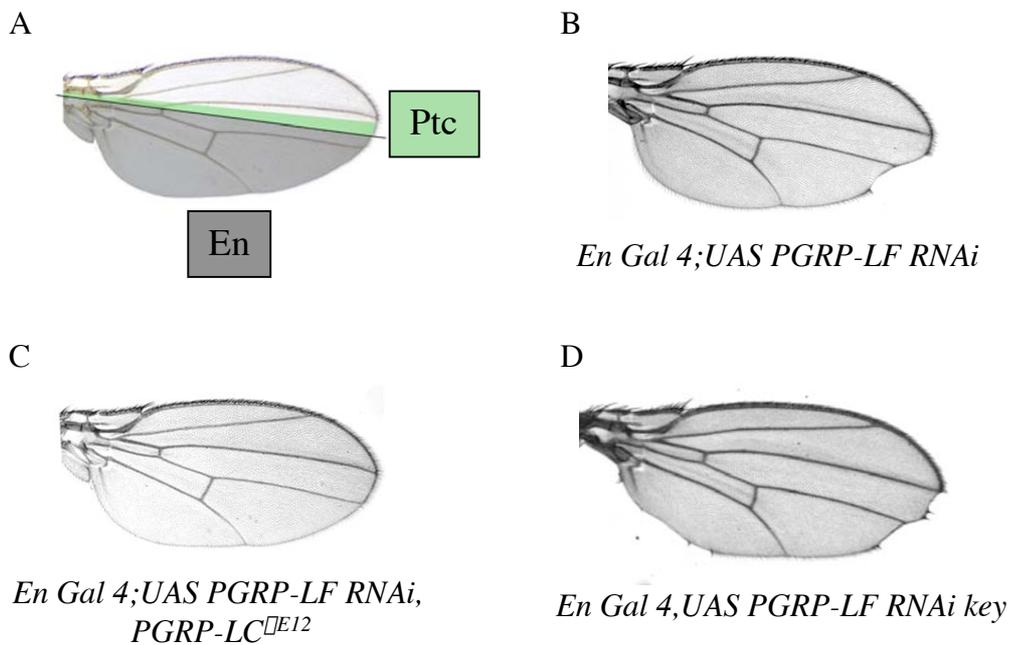


Figure 26 : Rôle de PGRP-LF au cours du développement

- A. Profil d'expression dans l'aile des drivers *EnGal4* et *PtcGal4*
- B. L'invalidation de PGRP-LF dans le compartiment postérieur du disque de l'aile au cours du développement (*En Gal 4;UAS PGRP-LF RNAi*) provoque une indentation de l'aile de la drosophile.
- C. Le phénotype développemental observé dans l'aile est sauvé dans un mutant *PGRP-LC^{E12}*.
- D. Le phénotype d'indentation est aggravé dans un contexte mutant *key*.

diminution de l'expression de PGRP-LF conduisait toujours à une expression constitutive de la *Diptéricine* dans les différents contextes mutants testés (non montré). Il semblerait donc que l'expression de la *Diptéricine* dans ce contexte ne provienne pas d'une activation «classique» de la voie IMD.

2. Rôle de PGRP-LF au cours du développement

Le lien de PGRP-LF avec l'apoptose nous a conduit à regarder si PGRP-LF pouvait intervenir au cours du développement de la drosophile. Pour cela, nous avons choisi de nous intéresser au tissu particulier qu'est le disque imaginal de l'aile. Nous avons utilisé des drivers qui nous permettent de diminuer l'expression de PGRP-LF dans un territoire précis de l'aile (Figure 26 A). Nous avons observé que la diminution de l'expression de PGRP-LF dans le compartiment postérieur du disque de l'aile peut conduire à des défauts de développement qui se traduisent par une indentation de l'aile spécifiquement au niveau de ces structures (figure 26 B). De plus, nous avons été surpris d'observer que le pourcentage d'adultes qui présentent ce phénotype est significativement augmenté si les larves sont soumises à une infection naturelle par *E.coli* (figure 27). Ces observations nous indiquent que PGRP-LF joue un rôle au cours du développement de la drosophile et que ce rôle est en relation avec le contrôle de la réponse à l'infection.

Nous avons ensuite regardé si ce phénotype dépendait de la voie IMD. Nous avons observé dans un contexte mutant pour *PGRP-LC* un sauvetage du phénotype d'indentation (Figure 26 C). La suppression du phénotype dans un contexte mutant *PGRP-LC* démontre que l'activation non contrôlée de la voie IMD est responsable du phénotype observé. Cependant, contrairement à ce que nous avons observé en contexte mutant *PGRP-LC*, nous obtenons un aggravement du phénotype dans un contexte mutant *key* (Figure 26 D). La voie IMD possède un branchement en aval de TAK1 vers la voie JNK. Il a été démontré que l'activation de la voie JNK en réponse à une stimulation est maintenue quand la voie IKK/Rel est bloquée en aval de Tak1 (Park et al., 2004). Cette observation suggère qu'il existe un rétro contrôle de la voie JNK par la branche IKK/Rel. L'aggravation du phénotype observé dans un contexte mutant *key* pourrait s'expliquer par une suractivation de la voie JNK qui contrôle les mécanismes de l'apoptose.

	No treat.	E.coli
En Gal 4 UAS PGRP-LF RNAi	1,7% (135)	52% (31)
En Gal 4 UAS PGRP-LF RNAi: PGRP-LC-/-	0% (125)	0% (28)
Ptc Gal 4 UAS PGRP-LF RNAi	0% (100)	33% (24)
Ptc Gal 4	0% (87)	0% (52)
En Gal 4	0% (78)	0% (40)
UAS PGRP-LF RNAi	0% (102)	0% (35)

Figure 27 : Phénotype d'indentation causé par la diminution de l'expression de PGRP-LF au cours du développement dans le disque imaginal de l'aile

Ce tableau indique le pourcentage de drosophiles qui présentent une indentation de l'aile sans infection et après infection naturelle par *E. coli*

C. Conclusions

Nous avons mis en évidence que PGRP-LF joue un rôle de régulateur négatif de la voie IMD. Contrairement aux résultats obtenus pour les amidases PGRP-SC, le phénotype associé à la diminution de PGRP-LF est observé en absence d'infection, ce qui suggère que cette protéine ne possède pas de rôle dans la titration du ligand bactérien. Nos résultats indiquent également que la voie IMD est constamment maintenue sous contrôle pour éviter une activation inappropriée. D'autre part, nous avons montré que PGRP-LF est également un régulateur négatif de la voie JNK. Le lien entre ces deux voies de signalisation chez la drosophile est leur implication dans les processus d'apoptose, et nous avons démontré que PGRP-LF possédait une fonction dans la régulation de ce mécanisme. Cependant, PGRP-LF semble être important en dehors du contexte immunitaire. En effet, nous avons observé que l'inactivation de PGRP-LF au cours du développement conduit à des problèmes développementaux sérieux.

Il est à noter que tous les phénotypes que nous avons observés sont basés sur l'analyse d'un mutant hypomorphe. De ce fait, nous avons certainement sous-estimé l'effet réel de ce gène dans nos expériences. Il est vraisemblable qu'un allèle nul de PGRP-LF aura un phénotype de létalité.

D. Perspectives

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent des ambiguïtés importantes et soulèvent de nombreuses questions. En particulier, l'expression constitutive de la *Diptéricine* observée lors de la diminution de PGRP-LF ne semble pas être une conséquence de l'activation de la voie IMD puisqu'en contexte mutant pour *PGRP-LC*, *Tak*, *Dredd* ou *Key*, cette activation persiste. Les résultats obtenus lors de l'inactivation de PGRP-LF au cours du développement nous laissent plutôt penser qu'une hyper-activation de la voie JNK serait à l'origine des phénotypes que nous observons. Le branchement vers la voie JNK s'effectue au niveau de TAK1 en aval d'IMD. Nous proposons d'effectuer différentes épistasies, tout

d'abord avec IMD puis avec les différents membres de la voie JNK. Une étude récente menée *in vitro* indiquerait un rôle de la voie JNK dans la synthèse des peptides antimicrobiens (Kallio et al., 2005). Il nous semble alors intéressant de tester l'activation de la *Diptéricine* résultant de l'inactivation de PGRP-LF dans un contexte mutant pour la voie JNK.

D'autre part, il est surprenant que le phénotype observé au cours du développement soit dépendant de PGRP-LC, alors qu'il est indépendant de cette molécule dans l'activation de la voie IMD. Il a été démontré que PGRP-LE était nécessaire en amont de la voie IMD pour activer la transcription des gènes de l'immunité au cours d'une infection bactérienne et que cette activation n'est que partiellement située en amont de PGRP-LC. Une étude en contexte mutant pour PGRP-LE ainsi qu'en contexte double mutant PGRP-LE/PGRP-LC pourrait nous donner des indications sur le mode d'activation de la synthèse de la *Diptéricine* par la diminution de PGRP-LF. En effet, PGRP-LE pourrait être requis au niveau du corps gras mais pas au niveau du disque de l'aile.

Les données actuelles concernant PGRP-LF ne permettent pas de déterminer sa fonction précise dans l'immunité. Cependant, son implication dans d'autres processus chez la drosophile tels que le développement ou l'apoptose indique que PGRP-LF pourrait jouer un rôle en dehors du contexte de la réponse immunitaire.

DISCUSSION

DISCUSSION

Des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de détection des microorganismes. Cette reconnaissance repose sur le contact entre les récepteurs de l'immunité (les PRRs) et l'agent microbien. La reconnaissance du PGN représente une étape clé dans le déclenchement de la réponse à l'infection et la synthèse des peptides antimicrobiens chez la drosophile. En effet, les premières études réalisées sur les PGRPs de la drosophile ont démontré un rôle de ces protéines dans la reconnaissance des bactéries à travers leur PGN. Ainsi, PGRP-LC et PGRP-LE détectent la présence des bactéries à Gram-négatif et activent la voie IMD (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002b; Takehana et al., 2004). PGRP-SA et PGRP-SD participent à la reconnaissance des infections à Gram-positif et déclenchent la voie Toll (Bischoff et al., 2004; Michel et al., 2001). Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude des PGRP-SCs renforcent l'idée que le PGN puisse être le seul inducteur de la réponse immunitaire chez la drosophile et semble écarter l'implication des autres PAMPs, comme le LPS ou le LTA, dans le déclenchement de la synthèse des peptides antimicrobiens. Chez la drosophile, le récepteur Toll n'est pas un PRR car il ne reconnaît pas directement le PGN mais un ligand endogène présent dans l'hémolymphe. Chez les mammifères, bien qu'une interaction directe entre les différents récepteurs TLRs et leurs ligands n'ait pas encore été démontrée, plusieurs études proposent que ce sont des PRRs (da Silva Correia et al., 2001; Poltorak et al., 2000). Contrairement à la situation chez les mammifères, les autres récepteurs Toll de la drosophile ne semblent pas participer à la réponse immunitaire. Nous sommes donc ici en présence d'une divergence importante dans la fonction de deux familles de protéines fortement conservées au cours de l'évolution.

Chez les mammifères, le PGN joue également un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Deux familles de protéines, les PGRPs et les NODs, participent à la reconnaissance de ce constituant. Peu de données existent sur le rôle des PGRPs dans la réponse à l'infection suite à la reconnaissance du PGN. PGRP-L est capable de cliver le PGN et fait partie de la famille des NAMLAA (Gelius et al., 2003). Cependant la fonction de cette enzyme *in vivo* n'a pas encore été démontrée. PGRP-S ne possède pas d'activité enzymatique, cette protéine semble être impliquée dans l'élimination des bactéries présentes dans les neutrophiles (Dziarski et al., 2003). Les protéines NOD1 et NOD2 sont présentes dans le

cytoplasme des cellules épithéliales où elles assurent la détection du PGN des bactéries intracellulaires. Les epithelia sont constamment en contact avec différentes classes de bactéries qui peuvent être commensales ou pathogènes. A ce niveau, la difficulté rencontrée par le système immunitaire réside dans la discrimination entre bactéries dangereuses et inoffensives. Cette discrimination est en partie réalisée chez les mammifères par l'absence de récepteurs TLRs à la surface des cellules épithéliales, dont la défense repose sur la détection des bactéries, après leur entrée dans le cytoplasme, par les NODs intracytoplasmiques et les TLRs présents dans les vésicules (Viala et al., 2004). Chez la drosophile, un des mécanismes de tolérance des bactéries du tube digestif pourrait provenir du rôle que nous avons mis en évidence pour les PGRP-SCs. En effet, les PGRP-SCs dégraderaient le PGN relargué par ces bactéries pour empêcher la stimulation constante du système immunitaire.

D'autre part, nous avons mis en évidence que la réponse immunitaire de la drosophile doit être contrôlée pour empêcher les effets délétères d'une activation non appropriée. Nous avons montré que les PGRP-SCs sont impliqués dans le contrôle de l'activation de la voie IMD en réponse à une infection par les bactéries à Gram-négatif. Ce rôle passerait par la dégradation du PGN relargué par les bactéries limitant ainsi sa reconnaissance par le récepteur PGRP-LC. Une fonction similaire a été proposée pour PGRP-LB, cette protéine serait également capable de reconnaître et de cliver le PGN (Anna Zaidman et Bruno Lemaître, communication personnelle). L'activité de ces protéines est à rapprocher du rôle joué par les enzymes qui détoxifient le LPS par déacétylation et déphosphorylation du lipide A qui représente le motif reconnu par TLR4 (Munford, 2005). Par ailleurs, nous montrons un rôle pour PGRP-LF dans la régulation négative des voies IMD et JNK de la drosophile. Sa fonction serait de prévenir une activation constitutive de ces voies en absence d'infection. Cependant, des études complémentaires sont nécessaire pour comprendre son mécanisme d'action. Ces travaux indiquent qu'il existe de nombreux points de contrôle de l'activation des voies de signalisation chez la drosophile.

L'ubiquitinylation est un autre mécanisme qui permet de réguler l'activation des voies de signalisation chez la drosophile. Par exemple, il a été démontré que cette modification post traductionnelle est impliquée dans le contrôle de l'apoptose. En effet, les molécules IAPs (Inhibitor of Apoptosis) suppriment l'apoptose en se liant aux caspases Reaper, Hid et Grim et en les ciblant pour la dégradation via le protéasome par ubiquitinylation (Wilson et al.,

2002). Inversement, ces caspases sont capables d'induire l'ubiquitylation de IAP lui-même pour induire l'apoptose (Holley et al., 2002). L'activation de la voie IMD semblerait également faire intervenir ce système. En effet, la translocation de Relish impliquerait l'action des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, Bendless/Ubc13 et dUEV1 (Zhou et al., 2005). Il a également été suggéré que la voie IMD était réprimée via la dégradation de Relish par le protéasome sous l'action d'un complexe ubiquitine-ligase (Khush et al., 2002). D'autre part, une ubiquitine-ligase a également été impliquée dans la terminaison de l'activation des voies JNK et IMD en se liant à TAK1 et en provoquant sa dégradation (Tsuda et al., 2005).

Différents mécanismes empêchant un emballement du système immunitaire ont été découverts ces dernières années. Ceci souligne qu'il est important de contrôler son activation afin d'éviter des conséquences plus néfastes qu'utiles à l'organisme.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

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.

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.

Anderson, K. V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42, 779-789.

Arziman, Z., Horn, T., and Boutros, M. (2005). E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Res* 33, W582-588.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.

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

Basset, A., Tzou, P., Lemaitre, B., and Boccard, F. (2003). A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep* 4, 205-209.

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.

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.

Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916.

Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 711-722.

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.

Cerenius, L., and Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198, 116-126.

Chang, C. I., Ihara, K., Chelliah, Y., Mengin-Lecreulx, D., Wakatsuki, S., and Deisenhofer, J. (2005). Structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10279-10284.

Chang, C. I., Pili-Floury, S., Herve, M., Parquet, C., Chelliah, Y., Lemaitre, B., Mengin-Lecreulx, D., and Deisenhofer, J. (2004). A *Drosophila* pattern recognition receptor contains a peptidoglycan docking groove and unusual L,D-carboxypeptidase activity. *PLoS Biol* 2, E277.

Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J. W., and Studier, F. W. (1994). The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4034-4038.

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.

Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A., and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol* 2, E196.

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

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

Dorman, C. J., McKenna, S., and Beloin, C. (2001). Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. *Int J Med Microbiol* 291, 89-96.

Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat Immunol* 6, 946-953.

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.

Dziarski, R., Platt, K. A., Gelius, E., Steiner, H., and Gupta, D. (2003). Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with nonpathogenic gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)-deficient mice. *Blood* 102, 689-697.

Ekenren, S., Tryselius, Y., Dushay, M. S., Liu, G., Steiner, H., and Hultmark, D. (2001). A humoral stress response in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 1479.

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

Engstrom, Y., Kadalayil, L., Sun, S. C., Samakovlis, C., Hultmark, D., and Faye, I. (1993). kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J Mol Biol* 232, 327-333.

Evans, C. J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* 5, 673-690.

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

Foley, E., and O'Farrell, P. H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* 17, 115-125.

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.

Galko, M. J., and Krasnow, M. A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* 2, E239.

Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710-720.

Gelius, E., Persson, C., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 988-994.

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

Geuking, P., Narasimamurthy, R., and Basler, K. (2005). A Genetic Screen Targeting the TNF/Eiger Signaling Pathway: Identification of *Drosophila* TAB2 as a Functionally Conserved Component. *Genetics*.

Girardin, S. E., and Philpott, D. J. (2004). Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur J Immunol* 34, 1777-1782.

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.

Goldman, W. E., Klapper, D. G., and Baseman, J. B. (1982). Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect Immun* 36, 782-794.

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.

Guan, R., Malchiodi, E. L., Wang, Q., Schuck, P., and Mariuzza, R. A. (2004). Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein Ialpha. *J Biol Chem* 279, 31873-31882.

Guan, R., Roychowdury, A., Ember, B., Kumar, S., Boons, G. J., and Mariuzza, R. A. (2005a). Crystal structure of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in complex with a muramyl tripeptide from Gram-positive bacteria. *J Endotoxin Res* 11, 41-46.

Guan, R., Wang, Q., Sundberg, E. J., and Mariuzza, R. A. (2005b). Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution. *J Mol Biol* 347, 683-691.

Ha, E. M., Oh, C. T., Ryu, J. H., Bae, Y. S., Kang, S. W., Jang, I. H., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2005). An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev Cell* 8, 125-132.

Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.

-
- Hanratty, W. P., and Dearolf, C. R. (1993). The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* 238, 33-37.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Holley, C. L., Olson, M. R., Colon-Ramos, D. A., and Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat Cell Biol* 4, 439-444.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130, 4955-4962.
- 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.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., *et al.* (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
- Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., and Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *Embo J* 21, 3009-3018.
- Ip, Y. T., Kraut, R., Levine, M., and Rushlow, C. A. (1991). The dorsal morphogen is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts with a long-range repression element in *Drosophila*. *Cell* 64, 439-446.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J. A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7, 335-350.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R. A., and Ramet, M. (2005). Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect.*
- Kambris, Z., Bilak, H., D'Alessandro, R., Belvin, M., Imler, J. L., and Capovilla, M. (2003). DmMyD88 controls dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *EMBO Rep* 4, 64-69.
- Kambris, Z., Hoffmann, J. A., Imler, J. L., and Capovilla, M. (2002). Tissue and stage-specific expression of the Toll in *Drosophila* embryos. *Gene Expr Patterns* 2, 311-317.

Kaneko, T., Goldman, W. E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N. (2004). Monomeric and Polymeric Gram-Negative Peptidoglycan but Not Purified LPS Stimulate the *Drosophila* IMD Pathway. *Immunity* 20, 637-649.

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.

Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gateff, E., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (1993). Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a kappa B-related sequence confer inducibility to the dipterin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *Embo J* 12, 1561-1568.

Kauppila, S., Maaty, W. S., Chen, P., Tomar, R. S., Eby, M. T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S. K., *et al.* (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. *Oncogene* 22, 4860-4867.

Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 18, 896-898.

Khush, R. S., Cornwell, W. D., Uram, J. N., and Lemaitre, B. (2002). A ubiquitin-proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficiency signaling cascade. *Curr Biol* 12, 1728-1737.

Kim, M. S., Byun, M., and Oh, B. H. (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat Immunol* 4, 787-793.

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.

Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., *et al.* (2005). Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. *Embo J*.

Kockel, L., Homsy, J. G., and Bohmann, D. (2001). *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene* 20, 2347-2364.

Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M., *et al.* (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335-346.

Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Daffre, S., Samakovlis, C., and Hultmark, D. (1992). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Mol Gen Genet* 232, 335-343.

Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M., and Hoffmann, J. A. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11427-11432.

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

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.

Lee, W. J., Lee, J. D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J., and Brey, P. T. (1996). Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7888-7893.

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

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

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., 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.
- 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.
- Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., and Read, A. F. (2003). Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr Biol* *13*, 489-492.
- Liu, C., Gelius, E., Liu, G., Steiner, H., and Dziarski, R. (2000). Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. *J Biol Chem* *275*, 24490-24499.
- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001). Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* *276*, 34686-34694.
- Liu, H., Su, Y. C., Becker, E., Treisman, J., and Skolnik, E. Y. (1999). A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr Biol* *9*, 101-104.
- 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.
- Meister, M., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (2000). The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* *248*, 17-36.
- Meister, M., and Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* *5*, 573-580.
- Mellroth, P., Karlsson, J., Hakansson, J., Schultz, N., Goldman, W. E., and Steiner, H. (2005). Ligand-induced dimerization of *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 6455-6460.
- Mellroth, P., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem* *278*, 7059-7064.
- 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.

-
- Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2005). Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J Endotoxin Res* *11*, 105-111.
- Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A. M., Manouvrier-Hanu, S., Hafner, R., Chamailard, M., Zouali, H., Thomas, G., and Hugot, J. P. (2001). CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* *29*, 19-20.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.
- 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.
- Moreno, E., Yan, M., and Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* *12*, 1263-1268.
- Munford, R. S. (2005). Detoxifying endotoxin: time, place and person. *J Endotoxin Res* *11*, 69-84.
- Muppidi, J. R., Tschopp, J., and Siegel, R. M. (2004). Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* *21*, 461-465.
- 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., 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.
- Noselli, S., and Agnes, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 466-472.
- Ochiai, M., and Ashida, M. (1999). A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* *274*, 11854-11858.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., *et al.* (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603-606.
- Onfelt Tingvall, T., Roos, E., and Engstrom, Y. (2001). The imd gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Rep* *2*, 239-243.

-
- Park, J. M., Brady, H., Ruocco, M. G., Sun, H., Williams, D., Lee, S. J., Kato, T., Jr., Richards, N., Chan, K., Mercurio, F., *et al.* (2004). Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* *18*, 584-594.
- Park, J. T. (2001). Identification of a dedicated recycling pathway for anhydro-N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine derived from *Escherichia coli* cell wall murein. *J Bacteriol* *183*, 3842-3847.
- Philpott, D. J., Belaid, D., Troubadour, P., Thiberge, J. M., Tankovic, J., Labigne, A., and Ferrero, R. L. (2002). Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol* *4*, 285-296.
- Poltorak, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Citterio, S., and Beutler, B. (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 2163-2167.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., and Manfrulli, P. (2002a). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* *241*, 145-156.
- Ramet, M., Manfrulli, 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., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., and Ezekowitz, R. A. (2001). *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* *15*, 1027-1038.
- 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.
- Reiser, J. B., Teyton, L., and Wilson, I. A. (2004). Crystal structure of the *Drosophila* peptidoglycan recognition protein (PGRP)-SA at 1.56 Å resolution. *J Mol Biol* *340*, 909-917.
- Royet, J., and Reichhart, J. M. (2003). Detection of peptidoglycans by NOD proteins. *Trends Cell Biol* *13*, 610-614.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000). Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat Immunol* *1*, 342-347.
- Schleifer, K., and Kandelr, P. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* *36*, 407-477.

Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., and Maniatis, T. (2003). Immune activation of NF-kappaB and JNK requires Drosophila TAK1. *J Biol Chem* 278, 48928-48934.

Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J., and Ip, Y. T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila. *Genes Dev* 10, 2745-2758.

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

Spencer, E., Jiang, J., and Chen, Z. J. (1999). Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. *Genes Dev* 13, 284-294.

Stenbak, C. R., Ryu, J. H., Leulier, F., Pili-Floury, S., Parquet, C., Herve, M., Chaput, C., Boneca, I. G., Lee, W. J., Lemaitre, B., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the Drosophila immune deficiency pathway. *J Immunol* 173, 7339-7348.

Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., and Hultmark, D. (2000). Activation of the Drosophila NF-kappaB 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-kappa B factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5991-5996.

Stronach, B. (2005). Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. *Dev Dyn* 232, 575-584.

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.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.

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

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.

Tsuda, M., Langmann, C., Harden, N., and Aigaki, T. (2005). The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep.*

Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737-748.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., *et al.* (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 5, 1166-1174.

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., Borge-Renberg, K., Mellroth, P., Steiner, H., and Hultmark, D. (2003). Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem* 278, 26319-26322.

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.

Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D. A., Agapite, J., Steller, H., and Meier, P. (2002). The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 445-450.

Xu, M., Wang, Z., and Locksley, R. M. (2004). Innate immune responses in peptidoglycan recognition protein L-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24, 7949-7957.

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.

Yoshida, H., Ochiai, M., and Ashida, M. (1986). Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system. *Biochem Biophys Res Commun* 141, 1177-1184.

Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D. S., Chung, Y., Chen, Z. J., and Maniatis, T. (2005). The role of ubiquitnation in *Drosophila* innate immunity. *J Biol Chem*.

ANNEXE

Au cours de ma thèse, j'ai également contribué à l'étude du rôle de PGRP-SD dans la réponse immunitaire de la drosophile. La caractérisation du phénotype des mutants *PGRP-SD* est décrite dans une publication parue dans *Nature Immunology* en 2004.

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

Vincent Bischoff, **Cécile Vignal**, Ivo G. Boneca, Tatiana Michel, Jules A. Hoffmann & Julien Royet

Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria .

Nature Immunology 5, 1175-1180 (2004)

Pages 1175-1180 :

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

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

<http://www.nature.com/ni/journal/v5/n11/pdf/ni1123.pdf>

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