

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 de Strasbourg

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par

Vincent BISCHOFF

Rôle des PGRPs dans l'activation et dans le contrôle de la
réponse immunitaire de *Drosophila melanogaster*

Soutenue publiquement le 20 octobre 2006 devant la commission d'examen :

Dr. Philippe SANSONETTI (rapporteur externe)

Dr. Jacques PRADEL (rapporteur externe)

Pr. Jean-Luc SOUCIET (rapporteur interne)

Dr. Jules HOFFMANN (co-directeur de thèse)

Pr. Julien ROYET (directeur de thèse)

Imagination is more important than knowledge.
For knowledge is limited to all we know and understand,
while imagination embraces the entire world, and all there ever will be to know
and understand.

Albert Einstein

Monsieur Hoffmann, j'aimerais tout d'abord vous remercier chaleureusement pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. J'ai en effet pu bénéficier durant ces quatre années, d'un environnement scientifique de grande qualité et d'importants moyens de travail. Je vous remercie également pour le vif intérêt que vous n'avez cessé de porter à mon travail.

J'exprime toute ma gratitude à Messieurs Philippe Sansonetti, Jean-Luc Souciet et Jacques Pradel, pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.

Julien, je tiens à t'adresser ici un immense MERCI pour avoir si bien accompagné mes premières années de recherche. Tu as en effet toujours été disponible et réceptif à mes nombreuses questions; tu as su me communiquer ton goût de la « belle science », ton esprit critique, et ton enthousiasme, quelles que soient les circonstances. Merci aussi pour avoir toujours encouragé mes initiatives, et pour m'avoir aidé dans les périodes de doute. Enfin, merci pour tous les moments « deep », passés à philosopher sur la vie et ses conséquences... Avec toi, la science s'est toujours faite dans la bonne humeur !

Merci Cécile pour ta constante joie de vivre, ta serviabilité, ainsi que ton active et enrichissante participation à l'équipe que nous avons formée pendant 3 ans.

Merci Marie, pour toutes les discussions, scientifiques ou non, que nous avons eu dans la pièce à mouche, ou ailleurs. Un grand merci aussi pour la relecture minutieuse de mon manuscrit.

Jean-Luc, merci pour nos discussions, tes conseils, et ta relecture du manuscrit

Merci aussi à Jean-Marc, Charles, Dominique et Vincent, pour votre aide au cours de ces quatre années.

Merci Sebahat pour ta gentillesse ainsi que pour la très grande qualité et la rigueur de ton aide dans les manips. Beaucoup de chercheurs seraient contents de t'avoir à leurs côtés. J'espère que la suite de ta carrière sera telle que tu le souhaites.

Merci Paule, pour toute la logistique que tu orchestres de main de maître. Que ferions-nous sans toi ?

Laure, Delphine, Hana, Nadège, Vanessa merci pour m'avoir supporté dans notre bureau, où j'étais un peu seul à représenter la gente masculine... merci pour nos discussions, et votre amitié.

Marie-Céline, Nadine, Yann, Laurent, Jean-Michel, Estelle, Richard, Annie, Marie-Eve, Rachel, Valérie, ainsi que tous les membres passés ou présents du labo que je ne peux citer ici, merci pour m'avoir aidé à un moment ou à un autre durant ces quatre années.

Manu, Marco, Gilles, Rico, Thierry et Cathy, tout simplement merci d'être des supers potes. Merci Mireille pour ta folie, elle est rafraîchissante ! Merci aussi Martine et John, même si on ne se voit plus beaucoup depuis que vous avez traversé l'océan Atlantique.

Raf, Lo, Math et Céline, merci pour votre amitié sans failles, elle est pour moi d'une très grande importance.

Merci à toute ma famille et ma belle famille, je ne peux citer tout le monde, la liste serait un peu longue... mais vous avez tous, depuis bien longtemps, contribué à mon bien-être. Merci Emmanuelle et Alex, on ne pourrait pas rêver meilleurs petite soeur et grand frère, et bien sûr merci Denis et Lilou. Merci Geneviève, Bertrand, mes deux supers-beaux-frères, et tous les autres membres de ma deuxième famille, pour m'avoir si gentiment accueilli dans le « clan d'Orbey ».

Maman, Papa, je ne pourrai jamais vous exprimer toute ma reconnaissance. Alors je veux juste vous remercier pour votre amour sans bornes, pour m'avoir toujours poussé, m'avoir aidé et soutenu dans mes choix, et enfin pour avoir toujours eu confiance en moi.

Enfin, merci à toi ma petite chérie, pour ton amour, ta patience, ta présence à mes côtés, jours après jours, quelles que soient les circonstances... tout simplement, merci d'être ma femme.

Abréviations

CRD	Cystein Rich Domain
DAP-PGN	<i>meso</i> -diaminopymélic acid type Peptidoglycan
DIAP	Drosophila Inhibitor of Apoptosis
DIF	Dorsal-related Immune Factor
FADD	Factor Associated Death Domain
GlcNac	<i>N</i> -acetylglucosamine
GM	<i>N</i> -acetylglucosamine - <i>N</i> -acetylmuramic acid
GNBP	Gram-Negative Binding Protein
I- \square B	Inhibitor of \square B
IKK	I \square B Kinase
IL-1R	Interleukin-1 Receptor
IMD	Immune Deficiency
IRAK	IL-1 Receptor Associated Factor
JAK/STAT	Janus Kinase/Sigal Transducer and Activator of Transcription
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
JNKK	c-Jun N-terminal Kinase Kinase
JNKKK	c-Jun N-terminal Kinase Kinase Kinase
LPS	LipoPolySaccharide
LRR	Leucin Rich Repeat
LTA	Lipoteichoic Acid
Lys-PGN	Lysine type Peptidoglycan
MAMP	Microbe Associated Molecular Pattern
<i>meso</i> DAP	<i>meso</i> -diaminopymélic acid
MurNac	<i>N</i> -acetylmuramic acid
NAMLAA	<i>N</i> -acetylmuramoyl-L-alanine amidase
NF- \square B	Nuclear Factor- \square B
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PGRP	Peptidoglycan Recognition Proteins
PGN	Peptidoglycan
PO	Phenoloxydase
PPO	Prophénoloxydase
PRR	Pattern Recognition Receptor
Q- RT- PCR	Quantitative Real Time PCR
RIP	Receptor Interacting Protein
SPE	Spätzle Processing Enzyme
TAB	TAK1 Associated Binding protein
TAK	TGF \square -Activated Kinase
TEP	ThioEster-containing Protein
TCT	Tracheal Cytotoxin
TIR	Toll-IL-1 Receptor
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factor

INTRODUCTION.....	3
I. IMMUNITÉ ADAPTATIVE ET IMMUNITÉ INNÉE.....	4
II. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE LA DROSOPHILE.....	5
A. <i>La drosophile, un modèle d'étude de l'immunité innée</i>	5
B. <i>Organisation structurale du système immunitaire de la drosophile</i>	6
1. La barrière épithéliale.....	6
2. L'hémolymphe.....	7
3. Le corps gras.....	7
4. Les hémocytes.....	8
C. <i>La réponse cellulaire</i>	8
1. La phagocytose.....	8
2. La signalisation.....	9
D. <i>La réponse humorale</i>	9
1. Les peptides antimicrobiens.....	9
2. La mélanisation.....	10
3. La coagulation.....	10
E. <i>Les voies de signalisation de l'immunité</i>	11
1. La voie Toll est activée en réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif.....	12
2. La voie IMD est activée en réponse aux infections par des bactéries à Gram-négatif et bacilles.....	14
3. La voie JNK.....	16
4. Parallèle entre les voies IMD et JNK et la voie du TNFR1 des mammifères.....	17
5. La voie JAK/STAT.....	18
III. MOTIFS MOLÉCULAIRES MICROBIENS ET RÉCEPTEURS DE L'IMMUNITÉ INNÉE.....	18
A. <i>Exemples de motifs moléculaires microbiens (MAMPs)</i>	19
1. Le LPS.....	19
2. Le PGN.....	20
B. <i>Quelques récepteurs de l'immunité innée</i>	22
1. Les TLRs.....	22
2. Les protéines NOD1 et NOD2.....	22
3. Les GNBPs.....	23
IV. LES PGRPs.....	24
A. <i>Les PGRPs de drosophile</i>	24
B. <i>Les PGRPs de mammifères</i>	26
V. BASES MOLÉCULAIRES DE LA RECONNAISSANCE PGRP/PGN.....	27
A. <i>Structure tridimensionnelle des PGRPs</i>	27
B. <i>Interaction entre PGRP et PGN</i>	28
1. Données biochimiques et structurales.....	29
2. Données physiologiques.....	31
PARTIE 1 PGRP-SD, UN PRR DES BACTÉRIES À GRAM-POSITIF.....	33
I. RÉSULTATS.....	34
A. <i>Article</i>	34
B. <i>Résultats complémentaires</i>	35
1. Recherche d'une interaction biochimique entre PGRP-SD et PGRP-SA ou GGBP-1.....	35
2. Structure tridimensionnelle de PGRP-SD.....	36
II. DISCUSSION.....	36
PARTIE 2 PGRP-SC1 ET PGRP-SC2 RÉGULENT L'INDUCTION DE LA VOIE IMD.....	40
I. RÉSULTATS.....	41
A. <i>Article</i>	41
B. <i>Résultats complémentaires</i>	43
1. La surexpression de PGRP-SC1 bloque l'induction des voies IMD et Toll suite à une infection.....	43
2. La surexpression d'une version de PGRP-SC1 mutée au niveau du site catalytique bloque également la voie IMD suite à une infection par des bactéries à Gram-négatif.....	43
II. DISCUSSION.....	44
PARTIE 3 PGRP-LF, RÉGULATEUR NÉGATIF DE PGRP-LC ET DE WENGEN/ EIGER.....	49
I. RÉSULTATS.....	50
A. <i>Locus génétique et protéine PGRP-LF</i>	50
B. <i>Expression de PGRP-LF</i>	50
C. <i>La surexpression de PGRP-LF bloque l'induction de la voie IMD</i>	51
D. <i>La diminution du taux de PGRP-LF induit l'activation de la voie IMD, indépendamment de toute infection</i>	51

1. Etablissement d'une lignée de drosophiles permettant la réduction du taux de transcrit de <i>PGRP-LF</i>	51
2. Effets de la réduction de PGRP-LF sur l'induction des peptides antimicrobiens.....	52
<i>E. La diminution de PGRP-LF induit une activation de la voie JNK, indépendamment de toute infection....</i>	<i>53</i>
<i>F. La diminution de PGRP-LF induit des défauts de développement.....</i>	<i>54</i>
1. Le gène pro-apoptotique <i>reaper</i> est activé par la diminution du taux de PGRP-LF	54
2. La diminution du taux de PGRP-LF provoque des défauts de développement	54
<i>G. Analyse d'un mutant de régulation de PGRP-LF</i>	<i>56</i>
1. Un mutant hypomorphe présentant une délétion dans la région promotrice de <i>PGRP-LF</i> , provoque la létalité au premier stade larvaire.....	56
2. Analyse épistatique du mutant PGRP-LF ¹²	57
<i>H. Recherche d'une interaction entre PGRP-LF et PGRP-LC ou Wengen.....</i>	<i>58</i>
II. DISCUSSION.....	58
DISCUSSION GÉNÉRALE	61
BIBLIOGRAPHIE.....	66

Introduction

Introduction

La survie d'un organisme eucaryote multicellulaire, et d'un point de vue plus général, le succès évolutif de l'espèce à laquelle il appartient, dépend entre autre de sa capacité à coexister avec un grand nombre de microorganismes, dont certains sont à son égard, pathogènes. Qu'il s'agisse de microorganismes d'origine virale, bactérienne ou fongique, de protozoaires ou bien encore de parasites multicellulaires, les mécanismes de l'évolution ont sélectionné de nombreuses stratégies de défense permettant aux animaux et aux plantes de résister à ces «Infections».

On retrouve cependant une caractéristique commune à toutes les espèces eucaryotes un système de défense appelé système immunitaire inné, basé sur l'élimination rapide d'un microorganisme infectieux grâce notamment à la production de molécules à activité antimicrobienne. A la différence du système adaptatif, dont ne disposent que les vertébrés gnathostomes, le système inné n'offre ni le vaste répertoire de reconnaissance que constituent les anticorps, ni la capacité de mémorisation qui en découle. Il est alors d'autant plus marquant de constater l'immense succès évolutif des espèces qui, comme les invertébrés, ne disposent que du système inné mais ont su coloniser l'ensemble des biotopes.

Le domaine de l'immunité s'est longtemps intéressé principalement au système adaptatif des vertébrés, mais depuis une quinzaine d'années un nombre croissant d'études ont mis en avant le rôle majeur joué par le système immunitaire inné. Il est alors apparu que ce système présentait une certaine complexité avec notamment chez les vertébrés, une interdépendance entre immunité innée et adaptative. C'est pourquoi l'utilisation d'un organisme modèle éprouvé comme la drosophile, ne disposant pas du système adaptatif, a permis d'appréhender plus facilement les mécanismes fondamentaux de l'immunité innée.

L'activation de la réponse immunitaire innée repose en partie sur la capacité du système à détecter la présence des microorganismes. Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à une famille de protéines de la drosophile, les PeptidoGlycan Recognition Proteins (PGRPs). Ces protéines, dont on retrouve des homologues chez les vertébrés, présentent la capacité de se lier au peptidoglycane (PGN), un composant majeur de la paroi des bactéries. Certains membres de cette famille agissent comme récepteurs du PGN, permettant de signaler la présence de bactéries au système immunitaire. Mon travail de thèse

montre que cette famille de protéines présente en fait une pluralité fonctionnelle permettant la détection du PGN bactérien, sa dégradation enzymatique, mais également la régulation de l'induction d'une des voies immunitaires.

I. Immunité adaptative et immunité innée

Comme nous venons de l'évoquer, deux grands types de systèmes immunitaires peuvent être décrits. Le premier système, évolutivement le plus ancien, est appelé système immunitaire inné. Que ce soit chez les plantes ou chez les animaux, la clef de la réponse innée est la reconnaissance du microorganisme infectieux. Cette reconnaissance s'effectue à travers la détection de molécules propres aux microbes et absentes en conditions normales chez l'individu non infecté (Hoffmann et al., 1999).

En 1989 Charles A. Janeway présente le modèle des PAMP/PRR (Pathogen Associated Molecular Pattern/Pattern Recognition Receptor) dans lequel il propose que l'évolution ait sélectionné chez les eucaryotes, des récepteurs (les PRRs) capables de reconnaître des molécules microbiennes (les PAMP) (Janeway, 1989). Cette théorie prévoit que les PAMPs sont des molécules essentielles à la survie du microorganisme, présentant donc très peu de variation d'une espèce microbienne à l'autre, et d'une génération à l'autre. Il est bien sûr nécessaire que les molécules microbiennes reconnues ne soient pas produites par l'organisme infecté. Ce système, prédisait Charles A. Janeway, doit permettre de distinguer «le non-soi infectieux du soi non-infectieux» (Janeway, 2001).

Ces motifs moléculaires microbiens sont présents chez tous les microorganismes, qu'ils soient pathogènes ou non. De plus, un même microorganisme peut être pathogène vis-à-vis d'un hôte mais pas vis-à-vis d'un autre. Il serait donc plus approprié de parler de MAMPs (Microbe Associated Molecular Pattern), terminologie que j'utiliserai dans ce manuscrit, plutôt que de Pathogen Associated Molecular Pattern.

De nombreux MAMPs reconnus par les plantes, les invertébrés et les vertébrés sont semblables, alors que les récepteurs utilisés pour les reconnaître présentent une assez grande diversité de structure et de fonctionnement (Ausubel, 2005). Certaines des molécules constituant ces MAMPs, ainsi que certaines familles de récepteurs permettant leur détection,

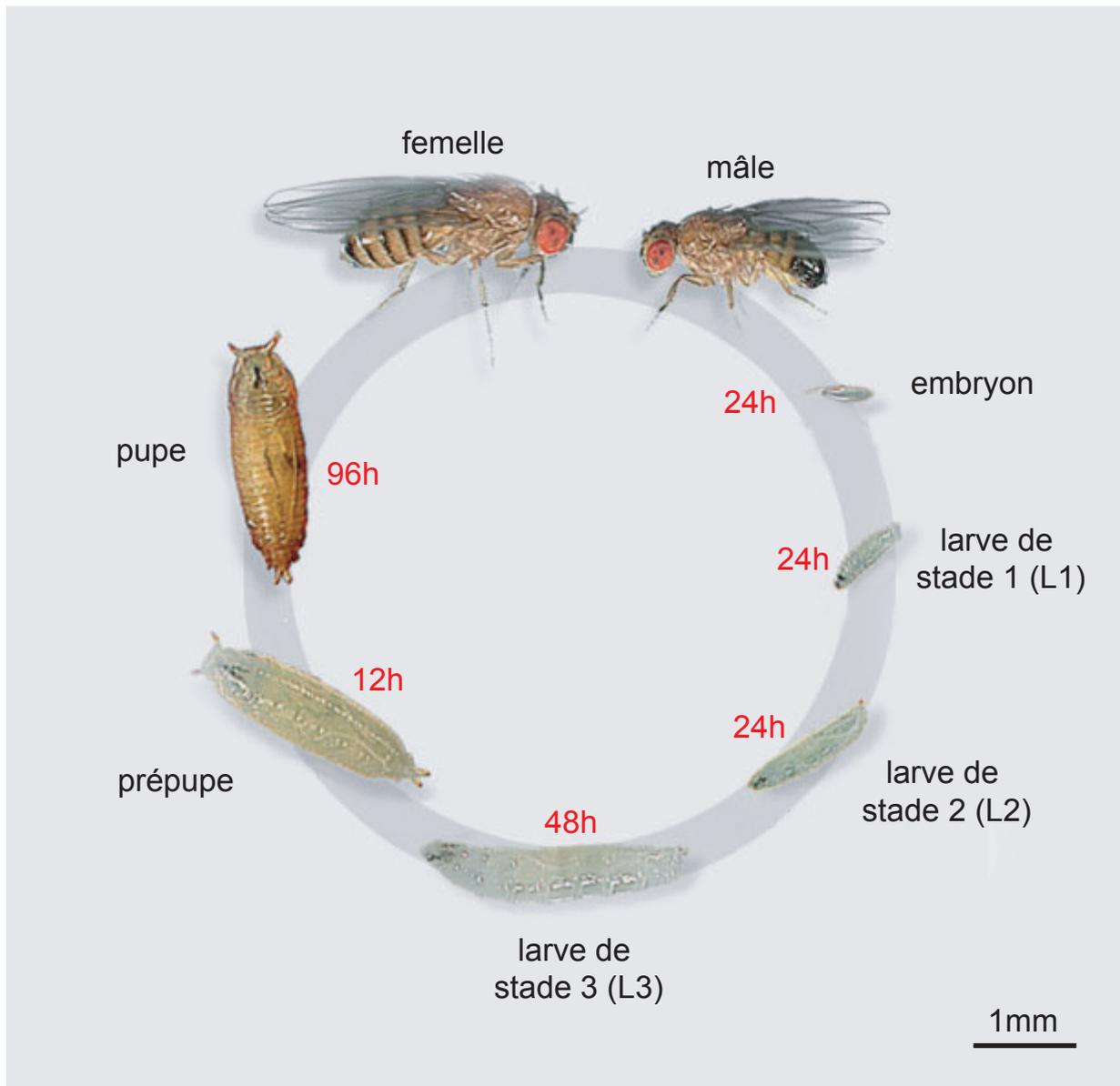


Figure 1. Cycle de développement de *Drosophila melanogaster* à 25°C.

Le stade embryonnaire dure 24 heures durant lesquelles se déroulent la gastrulation et la mise en place de l'ensemble des différents tissus larvaires, donnant ainsi naissance à la larve de premier stade L1. Suivent 3 stades larvaires durant lesquels l'organisation interne des tissus ne change pas. Après 4 jours de croissance, la larve s'empupe et commence sa métamorphose. Durant le stade pupal la plupart des tissus sont hystolysés, les organes adultes dérivant de groupes de cellules appelés histoblastes, propres à chaque tissu. D'autre part, différents amas cellulaires ectodermiques appelés disques imaginaux se développent durant les stades larvaires. Ils donnent naissance aux différentes parties du corps adulte: pièces buccales, yeux, antennes, ailes, pattes et thorax. L'ensemble du cycle dure environ 10 jours à 25°C. Les adultes atteignent la maturité sexuelle 8 heures après l'éclosion et leur durée de vie est de 2 à 3 mois.

seront présentées plus loin dans ce manuscrit (cf. Introduction.III). Il est également apparu qu'entre la réponse immunitaire des vertébrés et celle des invertébrés, il existe d'autres similitudes comme l'utilisation conservée de certaines voies de signalisation (Hoffmann, 2003).

Les vertébrés disposent, en plus de ce système inné, d'une réponse immunitaire adaptative. La spécificité de ce deuxième système réside dans sa capacité à générer une très grande diversité de molécules de reconnaissance, les anticorps. Ainsi, la détection d'un antigène particulier induit la sélection et l'expansion clonale du lymphocyte porteur de l'anticorps l'ayant reconnu. Ce système met en place un mécanisme de défense constitué de cellules effectrices et de cellules à mémoire réagissant spécifiquement à la présence de cet antigène particulier (Roitt I., 1993). Cependant, le système adaptatif des vertébrés ne fonctionne pas indépendamment du système inné. En effet, la reconnaissance des MAMPs par les récepteurs du système immunitaire inné, notamment les TLRs (Toll Like Receptors) et les NODs (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) (cf. Introduction.III.B.1,2), induit la sécrétion de cytokines et la production de molécules co-stimulatrices qui vont permettre de signaler l'infection aux cellules du système adaptatif (Kawai and Akira, 2005).

II. La réponse immunitaire de la drosophile

A. La drosophile, un modèle d'étude de l'immunité innée

Les insectes forment le groupe animal le plus vaste en termes de nombre d'espèces, de nombre d'individus, et d'écosystèmes colonisés. Il est très probable que leur incontestable succès évolutif soit en partie lié à l'efficacité de leur système immunitaire. Parmi les insectes, la mouche du vinaigre ou *Drosophila melanogaster* (drosophile), est le modèle génétique le plus étudié, et son utilisation pour l'analyse des mécanismes moléculaires du système immunitaire inné s'est donc imposée d'elle-même.

Ce modèle animal présente de nombreux avantages, comme un cycle de reproduction rapide, (10 jours à 25°C, Figure1), un génome entièrement séquencé et de mieux en mieux annoté. Différents outils moléculaires ont également été développés, grâce auxquels, on peut

générer assez rapidement (2 à 3 mois) des lignées transgéniques. Ces outils permettent par exemple, de diriger la surexpression ou l'extinction ciblée d'un gène, dans un tissu précis ou à un moment donné.

D'autre part, la drosophile comme beaucoup d'insectes, se développe et vit sur des milieux où prolifèrent beaucoup de microorganismes. Elle présente de ce fait une assez bonne résistance à un grand nombre d'infections. Il est également aisé de l'infecter expérimentalement (piqûre sceptique chez l'adulte, ingestion orale chez la larve et l'adulte), ce qui a permis de réaliser de nombreux cribles génétiques visant à identifier des mutations sensibilisant les mouches à l'infection. C'est grâce à ce type d'approche génétique que nous avons accumulé une grande partie des connaissances dont nous disposons à l'heure actuelle sur le système immunitaire de cet insecte.

Le système immunitaire des insectes est constitué d'une composante cellulaire avec les activités de phagocytose des microorganismes et d'encapsulation des parasites, ainsi que d'une composante humorale principalement basée sur la production de différentes familles de peptides antimicrobiens. On trouve également au sein de la réponse humorale, l'activation de cascades de protéases menant notamment à la production de mélanine.

B. Organisation structurelle du système immunitaire de la drosophile

Avant de décrire plus précisément les différents mécanismes mis en oeuvre par le système immunitaire inné des insectes, je vais rapidement présenter l'organisation structurelle permettant le fonctionnement de ce système.

1. La barrière épithéliale

Les insectes disposent d'un exosquelette produit par l'épithélium, qui secrète la cuticule majoritairement composée de chitine. Cette enveloppe, rigide chez la plupart des insectes adultes, représente une protection efficace empêchant un grand nombre de microorganismes de pénétrer dans la cavité interne.

D'autres épithéliums tels que ceux des trachées, du tube digestif ou des organes génitaux sont également des surfaces d'interaction privilégiées avec les microorganismes de l'environnement. Ils représentent à ce titre, comme la cuticule, une première ligne physique de défense du système immunitaire des insectes. Certains de ces épithéliums sont également capables de produire de façon constitutive, ou localement en réponse à une infection, tout une série de peptides à activité antimicrobienne (Ryu JH, 2004; Tzou et al., 2000).

Il faut enfin évoquer l'existence chez beaucoup d'insectes d'une structure appelée membrane péritrophique. On la trouve principalement chez les espèces vivant et se nourrissant sur des biotopes riches en microorganismes, et tapisse l'intérieur de tube digestif. Composée de chitine, de protéines, de protéoglycanes et de glycoprotéines, elle exerce une fonction de protection à peu près similaire à celle, proposée pour le mucus intestinal des vertébrés. La membrane péritrophique fonctionne ainsi comme un filtre, qui protège les cellules épithéliales intestinales et la cavité interne de l'insecte, du passage passif des microorganismes qui se trouvent dans le tube digestif (Lehane, 1997).

2. L'hémolymphe

L'hémolymphe des insectes est un fluide remplissant la cavité interne, dans laquelle baignent tous les organes de l'animal. Il peut être comparé au sang des vertébrés, même s'il n'en présente pas la fonction de transport de l'oxygène (fonction assurée chez les insectes par les trachées). On retrouve néanmoins des cellules appelées hémocytes, comparables à celles de la lignée myéloïde des vertébrés. L'hémolymphe est le milieu dans lequel se déroule la plus grande partie des réactions, de la détection de l'infection à la réponse immunitaire finale.

3. Le corps gras

L'organe immunitaire le plus important des insectes est le corps gras. Cet équivalent fonctionnel du foie des vertébrés est le site principal de synthèse des nombreux peptides antimicrobiens, produits lors de la réponse systémique à une infection. Il présente chez la larve une taille très importante formant des languettes de tissus qui remplissent la cavité de l'animal. Chez l'adulte le corps gras a une taille proportionnellement plus réduite et il est fixé sous l'épiderme.

4. Les hémocytes

Les hémocytes circulant dans l'hémolymphe ne constituent pas à proprement parler un organe, mais leur rôle dans la réponse immunitaire est important. On trouve majoritairement des plasmocytes dont la fonction principale est la phagocytose des microorganismes présents dans l'hémolymphe (Braun et al., 1998). Chez la larve, on trouve également des cellules à cristaux (moins de 5%) qui participent à la production de la mélanine. D'autre part, il existe chez la larve les lamellocytes dont la différenciation est induite par la présence de parasites. Même si les mécanismes mis en oeuvre sont encore mal compris, ces cellules ont une fonction importante dans l'encapsulation de parasites comme les oeufs de la guêpe *Leptopilina boulardi* (Crozatier et al., 2004).

C. La réponse cellulaire

1. La phagocytose

L'aspect principal de la réponse cellulaire est la phagocytose. Cette fonction, assurée par les plasmocytes, apporte une contribution essentielle à la capacité de résistance de la drosophile suite à une infection (Elrod-Erickson et al., 2000). Elle permet l'élimination rapide d'une bonne partie des microorganismes qui pénètrent dans la cavité interne de la drosophile. Différents récepteurs présents à la surface de ces cellules sont nécessaires à la fonction de phagocytose. On peut notamment citer dSR-CI et Eater, qui jouent un rôle important dans la détection des bactéries (Kocks et al., 2005; Ramet et al., 2001). Il existe également chez la drosophile une famille de protéines, les TEPs (ThioEster-containing Proteins), qui présentent des homologies avec la superfamille des α -2 macroglobulines/facteur C3 du complément des mammifères (Lagueux et al., 2000). Leur implication dans la phagocytose a récemment été démontrée chez la drosophile. Ainsi, TEP2 est important pour la phagocytose des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) et TEP3 pour celle de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Un analogue des protéines TEPs, Mcr (Macroglobuline complement related), est pour sa part nécessaire dans la phagocytose du champignon *Candida albicans* (Stroschein-Stevenson et al., 2006). Par analogie avec ce qui a été montré pour TEP1 chez *Anopheles gambiae*, il est

probable que ces protéines aient un rôle d'opsonisation des microorganismes (Levashina et al., 2001).

2. La signalisation

Un deuxième aspect du rôle joué par les hémocytes au cours de la réponse immunitaire, est la transmission du signal de l'infection aux autres tissus immunocompétents. On peut par exemple citer la production d'oxyde nitrique (NO) contribuant à l'induction de la réponse aux bactéries à Gram-négatif au niveau du corps gras (Foley and O'Farrell, 2003). De même, il a été montré que UPD3 (Unpaired-3), une protéine de type cytokine produite par les hémocyte, permet l'activation de la voie JAK-STAT dans les cellules du corps gras (Agaisse et al., 2003) (cf. Introduction II.E.5).

D. La réponse humorale

La production de peptides antimicrobiens est le mécanisme principal de la réponse humorale. La présence de microorganismes dans l'hémolymphe déclenche également différentes réactions comme l'activation de cascades protéolytiques menant à la mélanisation et à la coagulation.

1. Les peptides antimicrobiens

La synthèse de peptides antimicrobiens représente la partie la plus étudiée, ainsi qu'une facette importante de la réponse immunitaire innée des insectes. Le spectre d'activité de ces petits peptides (moins de 100 acides aminés) couvre un grand nombre de bactéries à Gram-négatif et positif, et de champignons (Imler and Bulet, 2005). Libérés dans l'hémolymphe de la drosophile, ils sont majoritairement synthétisés par les cellules du corps gras, dans le cadre de la réponse systémique (Meister et al., 2000). Ils peuvent également, dans une moindre mesure, être produit par les hémocytes. Enfin, les épithéliums de contact comme ceux du tube digestif ou des trachées, synthétisent certains de ces peptides dans le cadre d'une réponse de type locale (Ryu JH, 2004; Tzou et al., 2000).

La Cécropine, premier peptide antimicrobien à avoir été décrit, fut identifiée chez le lepidoptère *Hyalophora cecropia* (Steiner et al., 1981). Chez la drosophile, on dénombre 7 familles de peptides antimicrobiens □ Cécropine, Défensine, Drosomycine, Attacine, Drosocine, Diptéricine et Metchnikowine (Figure 2). À l’instar des défensines que l’on retrouve chez tous les eucaryotes, la plupart de ces peptides sont cationiques et amphipatiques. Comme les défensines la majorité des peptides antimicrobiens agissent vraisemblablement en s’insérant au sein de la bicouche phospholipidique membranaire. Cela perméabilise la membrane cytoplasmique du microorganisme ciblé, ce qui provoque l’efflux du contenu cytoplasmique. Le fait que les peptides antimicrobiens attaquent spécifiquement la bicouche phospholipidique des microorganismes, est dû à l’environnement ionique à forte charge négative, qui est spécifique aux membranes plasmiques procaryotes (liée à la présence de LPS (Lipopolysaccharide) et de LTA (acide lipotéichoïque)) (Ganz, 2003; Zasloff, 2002).

On peut classer les peptides antimicrobiens de drosophile en fonction de leur spectre d’activité. La Drosomycine et la Metchnikowine sont des peptides antifongiques. L’Attacine, la Cécropine, la Diptéricine et la Drosocine sont actifs contre les bactéries à Gram-négatif, alors que la Défensine et la Metchnikowine agissent contre les bactéries à Gram-positif (Figure 2).

2. La mélanisation

La cascade de protéases à sérine menant au clivage de la prophénoloxydase (PPO) en phénoloxydase (PO) induit la formation de dépôts de mélanine au niveau notamment d’une blessure de l’exosquelette d’un insecte. La PO catalyse l’oxydation des phénols en quinones, qui polymérisent ensuite spontanément pour former la mélanine (Cerenius and Soderhall, 2004). La mélanine en elle-même n’a pas d’activité antimicrobienne établie, mais certains intermédiaires de la réaction menant à sa production, comme les radicaux libres, sont toxiques pour les microorganismes. Chez de nombreux insectes, la détection d’un MAMP par un PRR peut déclencher la production de mélanine (Ma and Kanost, 2000). Chez la drosophile, la surexpression d’un membre des PGRPs, PGRP-LE, induit, en l’absence d’infection, la cascade de la PPO (Takehana et al., 2002).

3. La coagulation

En cas de rupture de la cuticule, il est important que cette barrière physique soit rapidement reconstituée. Le mécanisme de coagulation qui fait intervenir les hémocytes et différentes protéines, permet la formation d'un caillot d'hémolymph suite à une blessure. L'Hemolectin et Fondue, produites par les hémocytes, sont impliquées dans la formation de ce caillot. On notera cependant que ces protéines ne sont pas nécessaires pour la résistance de la drosophile à une infection et le déclenchement de la réponse immunitaire. Le coagulum, une fois formé, est en général renforcé par l'addition de mélanine (Bidla et al., 2005; Goto et al., 2003; Scherfer C, 2006).

E. Les voies de signalisation de l'immunité

Comme nous allons le voir, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans les différents aspects de la réponse immunitaire de la drosophile. Historiquement c'est cependant d'abord vers l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les peptides antimicrobiens, que l'intérêt s'est principalement porté. Les travaux sur ces gènes ont rapidement permis de se rendre compte que leur induction se faisait de façon différentielle en fonction du type de microorganisme en présence.

Les premières analyses des promoteurs des gènes codant pour ces peptides datent de 1993 et concernent la *Cécropine A1* et la *Diptéricine* (Engstrom et al., 1993; Kappler et al., 1993). Au sein de leurs promoteurs, il a ainsi été identifié, des séquences de régulation de type κ B. Ces motifs de régulation sont présents dans les promoteurs de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire des mammifères, et ils permettent la fixation des facteurs de transcription de type NF- κ B (Bonizzi and Karin, 2004).

Le seul facteur NF- κ B de drosophile connu à l'époque était la protéine Dorsal, le facteur de transcription de la voie Toll qui intervient dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale pendant les premiers stades du développement embryonnaire (Ip YT, 1991). Cependant, des mouches mutantes pour *dorsal* ne présentaient a priori aucun déficit de la réponse immunitaire (Lemaitre et al., 1995b). Deux autres facteurs NF- κ B, DIF (Dorsal-related Immune Factor) et Relish ont par la suite été caractérisés pour leur implication dans la réponse immunitaire (Dushay et al., 1996; Ip et al., 1993; Meng et al., 1999). Comme je vais le présenter, DIF et Relish sont les facteurs de transcription respectivement des voies

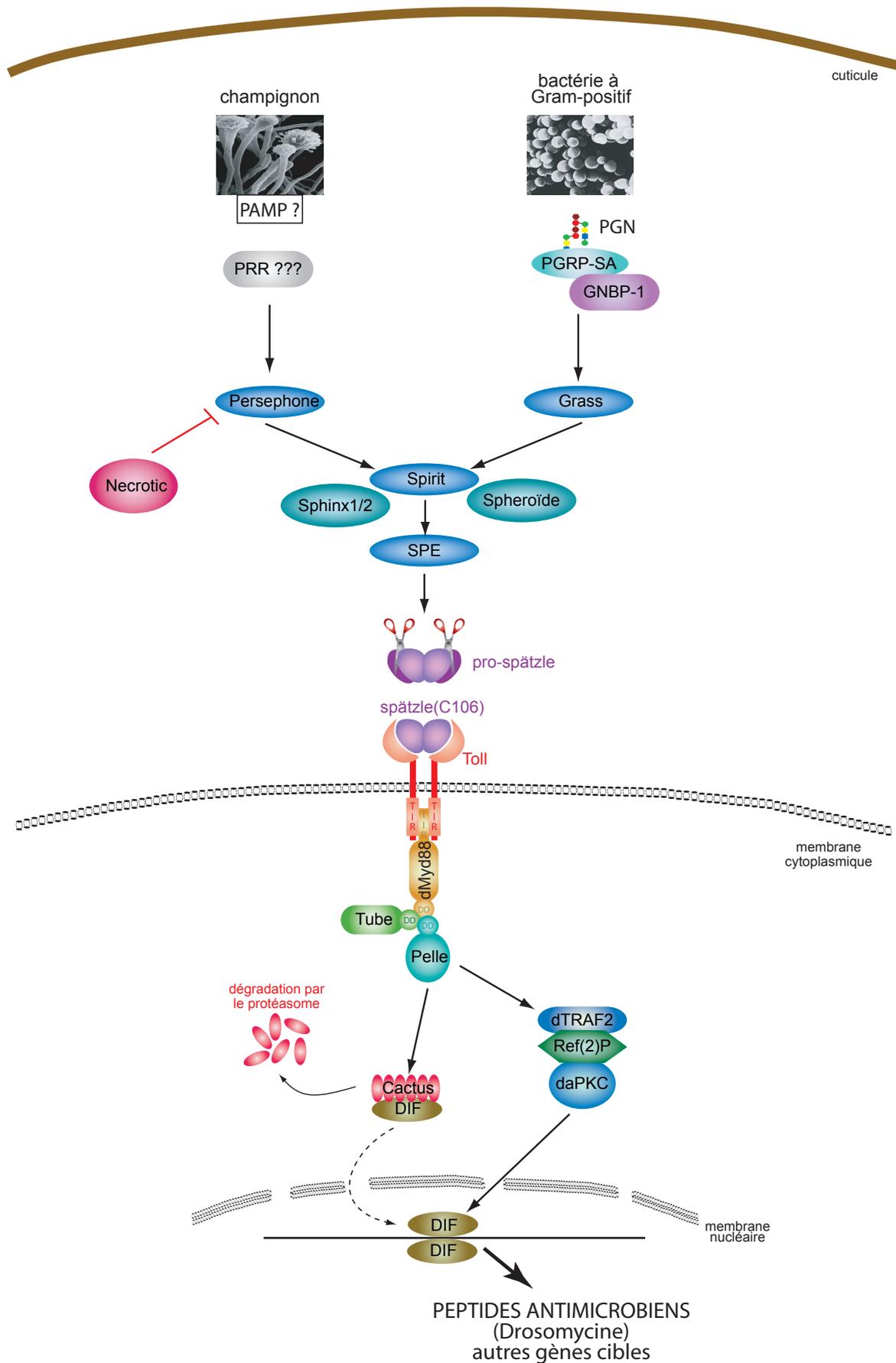


Figure 3. La voie Toll est activée au niveau des cellules du corps gras, en réponse à l'infection par les bactéries à Gram-positif et les champignons.
 Pour la description de cette voie de signalisation, se référer au texte.

moléculaires Toll et IMD, permettant l'activation de l'ensemble des gènes de peptides antimicrobiens.

1. La voie Toll est activée en réponse aux infections fongiques et bactériennes à Gram-positif

La voie Toll est connue depuis le début des années 80, pour son rôle dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale chez l'embryon (Belvin and Anderson, 1996). C'est également la première voie moléculaire caractérisée comme étant nécessaire à la régulation des peptides antimicrobiens, après une infection fongique ou bactérienne à Gram-positif (Lemaitre et al., 1996).

Le récepteur Toll a un domaine extracellulaire comportant des séquences riches en Leucine (LRR) ainsi qu'un domaine intra-cytoplasmique appelé TIR (Toll Interleukine-1 Receptor). Celui-ci est très homologue au même domaine du récepteur de l'interleukine-1 des mammifères (IL-1R) (Gay NJ, 1991). Toll est activé et dimérise suite à la fixation de la forme coupée de Spätzle (Spätzle C106), une protéine de type cytokine présente dans l'hémolymphe sous une forme entière inactive (pro-Spätzle) (Weber et al., 2003) (Figure 3). L'activation de Toll induit la formation d'un complexe intra-cytoplasmique composé des protéines adaptatrices dMyD88 (comportant un domaine TIR) et Tube ainsi que de la kinase Pelle. Ces protéines comportent toutes un domaine d'interaction protéine-protéine «Death Domain», ce qui permet leur association (Sun et al., 2002; Tauszig-Delamasure et al., 2002). Ce complexe protéique, une fois formé, va induire la phosphorylation de Cactus (homologue de I- κ B des mammifères) puis sa dégradation par le protéasome (Spencer et al., 1999). Cela permet la libération et la translocation nucléaire du facteur NF- κ B DIF qui était séquestré par Cactus dans le cytoplasme (Belvin and Anderson, 1996; Meng et al., 1999). Pelle est une sérine-thréonine kinase, mais on ne sait pas à l'heure actuelle si elle est directement responsable de la phosphorylation de Cactus. Un travail réalisé *in vitro* sur des cellules S2 de drosophile indique l'implication d'un complexe protéique dTRAF2/Ref(2)P/daPKC dans la régulation transcriptionnelle de la *drosomyine* (Avila et al., 2002). Ces protéines sont respectivement homologues aux protéines de mammifères TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6), p62 et aPKC (atypic Protein Kinase C). Il apparaît que ce complexe agit en aval de Tube, en

parallèle de Cactus, probablement en phosphorylant DIF, mais il n'est impliqué ni dans la dégradation de Cactus, ni dans la translocation nucléaire de DIF.

Les protéines dMyD88, Pelle, TRAF2 et Ref(2)P ont toutes des homologues chez les mammifères (respectivement MyD88, IRAK, TRAF6 et p62) qui participent à l'activation de la voie IL-1R. Le domaine TIR de Toll étant, de plus, homologue au domaine intracytoplasmique de IL-1R, il existe clairement une conservation entre la voie Toll et la voie IL-1R impliquée dans la réponse immunitaire des mammifères (Hoffmann, 2003). Il existe également des similitudes entre la voie Toll et les voies de signalisation TLR de mammifères

Les composants intra-cytoplasmiques de la voie Toll sont utilisés dans la transmission du signal chez l'embryon et au cours de la réponse immunitaire. Il semble que chez la larve, Dorsal puisse se substituer à DIF pour l'activation de la voie Toll suite à une infection.

Au cours du développement embryonnaire, la coupure protéolytique de Spätzle est réalisée grâce à une cascade de protéases à sérine (Nudel, Gastrulation defective, Snake, Easter). Aucune de ces protéines n'est cependant responsable de la coupure de Spätzle au cours de la réponse immunitaire, indiquant que d'autres protéases sont impliquées dans ce processus. Il a ainsi été démontré que lors d'une infection fongique, la protéase à sérine Persephone et l'inhibiteur de protéase Necrotic permettent la régulation de la coupure de Spätzle (Ligoxygakis et al., 2002a; Ligoxygakis et al., 2002b). Plus récemment une protéase à sérine nommée Grass a été décrite comme étant spécifiquement activée après la reconnaissance des bactéries à Gram-positif. Dans cette étude, sont également décrites deux protéases à sérine (Spirit et SPE) et deux homologues de protéases à sérine (Spheroïde et Sphinx1/2), activées suite à une infection par des bactéries à Gram-positif ou des champignons (Kambris et al., 2006). Il apparaît également que SPE (Spätzle Processing Enzyme) est la protéase à sérine qui coupe Spätzle (Jang et al., 2006).

L'activation de la voie Toll par des protéases apicales différentes indique que la détection des bactéries à Gram-positif et des champignons ne se fait pas selon les mêmes modalités. Il a en effet été montré que deux PRRs, PGRP-SA et GNBP-1 (Gram-negative Binding Protein-1), sont nécessaires pour la reconnaissance spécifique des bactéries à Gram-positif, à travers leur PGN, et l'activation de la voie Toll (cf. Partie 1.) (Gobert et al., 2003; Michel et al., 2001; Pili-Floury et al., 2004). L'identité du ou des PRRs permettant la détection des champignons n'est pour l'heure pas connue.

Drosophile

Mammifères

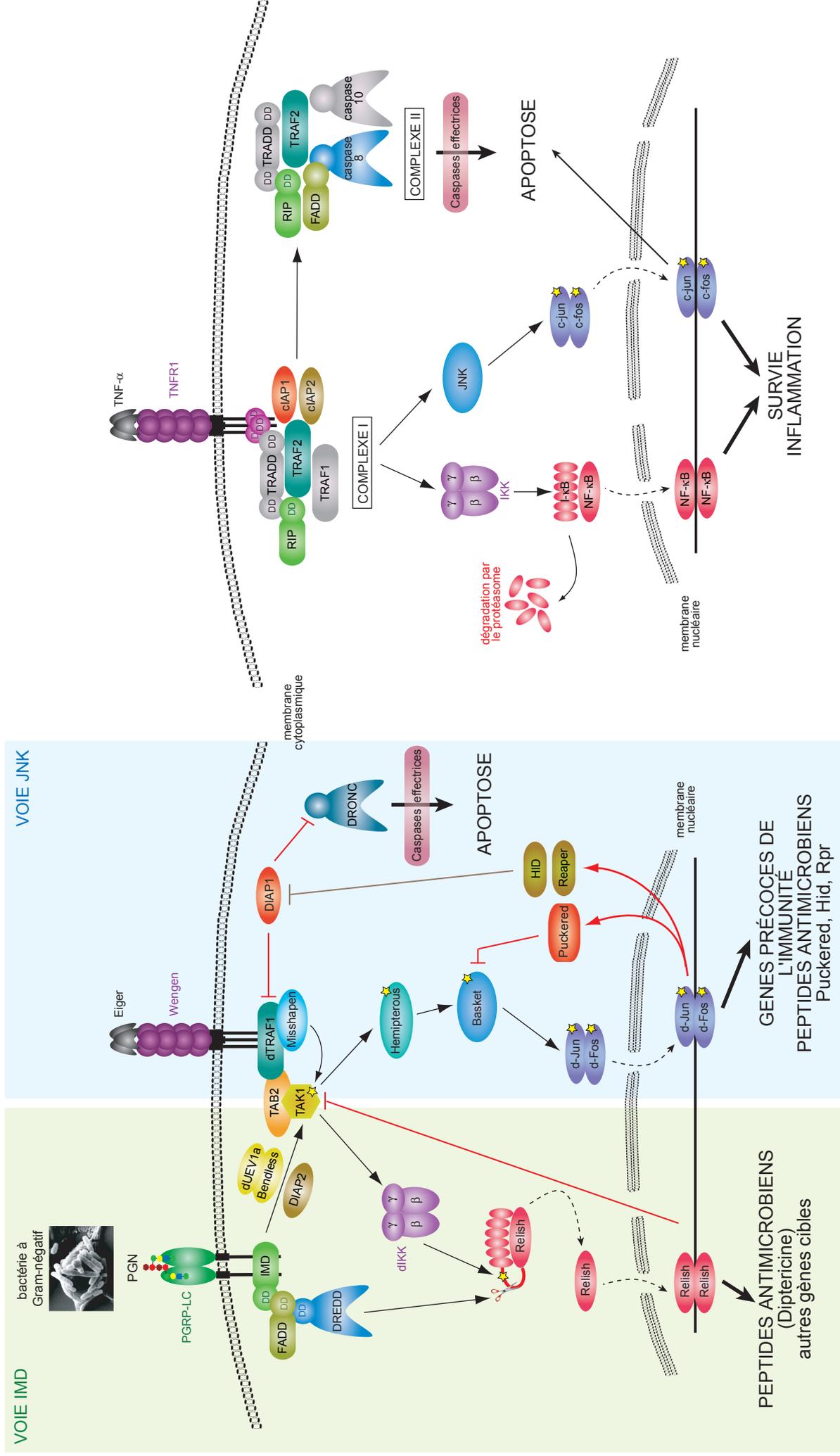


Figure 4. Parallèle entre les voies IMD et Wengen/JNK de la drosophile, et la voie TNFR-1 des mammifères.

2. La voie IMD est activée en réponse aux infections par des bactéries à Gram-négatif et bacilles

La voie IMD, dont le nom provient du premier constituant identifié (Immune Deficiency), est également une voie d'activation menant à la translocation nucléaire d'un facteur de transcription NF- κ B. La mutation *imd*, isolée en 1995, sensibilise les drosophiles à une infection par des bactéries à Gram-négatif, de même qu'elle bloque l'induction de certains peptides antimicrobiens comme la Diptéricine (Lemaitre et al., 1995a). IMD est une protéine adaptatrice à «Death Domain» homologue de la protéine RIP1 (Receptor Interacting Protein) de la voie du TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) des mammifères (Georgel et al., 2001).

La voie IMD utilise de nombreuses protéines homologues à celles de la voie du TNFR1. D'autre part, la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase), impliquée dans différents mécanismes développementaux, est aussi considérée comme étant un branchement de la voie IMD, et présente également des homologies avec la voie du TNFR1 (cf. Introduction.II.E3,4). Pour cette raison, j'ai représenté les voies IMD et JNK sur un même schéma, avec la voie du TNFR1 des mammifères en vis-à-vis (Figure 4).

PGRP-LC a récemment été caractérisée comme étant un récepteur de la voie IMD. Cette protéine qui appartient à la famille des PGRPs a également été décrite comme récepteur du PGN des bactéries à Gram-négatif et des bacilles (cf. Introduction.IV.A). Il a en effet été montré que le domaine intra-cytoplasmique de PGRP-LC interagit directement avec IMD (Choe KM, 2005). Par l'intermédiaire de leurs Death Domain, IMD interagit également avec dFADD (homologue de la protéine Factor Associated Death Domain des mammifères) et DREDD (homologue de la caspase-8) (Leulier et al., 2000; Naitza et al., 2002). Il a été proposé que IMD, dFADD et DREDD forment un complexe protéique permettant l'activation de la MAP kinase TAK1 (Transforming growth factor-Activated Kinase 1) (Zhou R, 2005). L'activation de TAK1 nécessite également la participation des enzymes ubiquitines Bendless et dUEV1a (homologues de Ubc13 et UEV1a) (Zhou R, 2005). La protéine TAK1, associée à TAB2 (TAK1 Associated Binding protein 2), constitue le point de branchement de la voie IMD vers l'activation de la voie JNK (Figure 4). Pour l'activation de la voie IMD, TAK1 et TAB2 forment un complexe permettant la phosphorylation de IKK (IKKappa-BKinase) (Vidal et al., 2001; Zhuang et al., 2006). IKK est constitué de 2 sous-unités régulatrices IKK γ (key) et de 2 sous-unités catalytiques IKK α (par analogie avec le complexe IKK des vertébrés) (Lu et al., 2001; Rutschmann et al., 2000). Une fois activé, le complexe

IKK phosphoryle le facteur de transcription NF- κ B Relish, 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 N-terminal Rel de liaison à l'ADN et un domaine ankyrine C-terminal semblable à celui de l'inhibiteur I- κ B (Dushay et al., 1996). Une fois phosphorylé, Relish est coupé, ce qui permet la séparation du domaine ankyrine et du domaine Rel. Le domaine Rel de liaison à l'ADN est ainsi libéré et passe dans le noyau où il active la transcription des gènes cibles (Stoven et al., 2000; Stoven et al., 2003). Même si cela n'a pas été directement démontré, il est très probable que la coupure endoprotéolytique de Relish soit effectuée par la caspase DREDD. Enfin, un travail récent indique que l'absence de protéine TAK1 fonctionnelle, n'empêche pas la translocation nucléaire et l'activation du facteur NF- κ B Relish (Delaney et al., 2006). Il est donc probable qu'une autre kinase soit fonctionnellement redondante avec TAK1 dans la phosphorylation complexe IKK.

Comme je l'ai décrit plus haut, l'activation de la voie Toll se fait par la fixation d'un ligand préalablement mûré par la cascade protéolytique, déclenchée par la reconnaissance du PGN. Ce mode d'activation permet l'amplification du signal de départ, grâce à la cascade de protéases. L'activation de la voie IMD se fait d'une façon différente car elle implique la reconnaissance du PGN, directement au niveau de son récepteur PGRP-LC. Cette différence dans la modalité d'activation permet à la voie IMD d'avoir un niveau d'induction théoriquement proportionnel au taux de PGN, et nécessite probablement des moyens de régulation différents.

L'induction de la diptéricine peut être activée par la surexpression des composants intra-cytoplasmiques de la voie IMD. D'autre part, il a été montré que la surexpression de cette voie est létale au stade larvaire, et qu'elle induit la transcription du gène pro-apoptotique *reaper*, qui est une cible de la voie JNK (Georgel et al., 2001).

3. La voie JNK

La voie c-Jun N-terminal kinase (JNK) est impliquée chez la drosophile dans de très nombreux processus comme la morphogénèse, l'apoptose, la cicatrisation, la réponse au stress, et la réponse immunitaire (Stronach, 2005). Comme je l'ai évoqué précédemment, l'activation de la voie JNK au cours de la réponse immunitaire, passe également par la kinase TAK1 et la protéine TAB2, (Delaney et al., 2006; Geuking et al., 2005; Silverman et al., 2003).

L'activation de la voie JNK est bien décrite pour l'induction de l'apoptose, avec la fixation du ligand Eiger (présentant des homologies avec le TNF- α des vertébrés) sur le récepteur Wengen (famille des TNFR) (Igaki et al., 2002; Kanda et al., 2002; Kauppila et al., 2003) (figure 4). Un complexe protéique dans lequel on trouve d'TRAF1 (homologue de TNF Receptor Associated Factor 2 des mammifères), TAB2, Misshapen et TAK1, facilite la phosphorylation de TAK1 par la Kinase Misshapen (Su YC, 1998). TAK1 active ensuite la JNKK hemipterous qui active à son tour la JNK Basket (Glise et al., 1995; Sluss et al., 1996). JNK permet alors la phosphorylation des facteurs de transcription AP-1, d-Jun (JRA pour Jun-Related Antigen) et d-fos (Kayak) (Kockel et al., 2001).

Ces facteurs de transcription permettent la régulation de nombreux gènes cibles parmi lesquels on trouve *puckered*, qui code pour une phosphatase permettant l'inhibition de la JNK Basket. La voie JNK régule également la transcription des gènes *reaper* et *hid* qui codent pour deux protéines pro-apoptotiques, qui en bloquant DIAP1 (Drosophila Inhibitor of Apoptosis 1), libèrent l'apoptosome de son inhibition et permettent l'activation des caspases effectrices de l'apoptose (Varfolomeev and Ashkenazi, 2004).

Dans la réponse immunitaire, la voie JNK semble jouer un rôle précoce et transitoire, en permettant l'activation rapide des gènes liés aux processus de cicatrisation, de réarrangement du cytosquelette et de réponse au stress (Boutros et al., 2002; Galko and Krasnow, 2004). Il a également été récemment démontré que la voie JNK permet l'activation des gènes de peptides antimicrobiens et coopère avec la voie IMD dans leur contrôle transcriptionnel (Delaney et al., 2006; Kallio et al., 2005).

Il existe néanmoins une régulation négative mutuelle entre les voies JNK et IMD. Ainsi, l'activation du facteur de transcription NF- κ B Relish exerce, à travers la dégradation de TAK1, un contrôle négatif sur la voie JNK. Cela permet vraisemblablement de réguler l'aspect transitoire de l'activation de la voie JNK au cours de la réponse immunitaire (Park et

al., 2004). Les facteurs de transcription AP-1 de la voie JNK peuvent également agir comme antagonistes de Relish dans sa fixation sur le promoteur de certaines de ces cibles (Kim et al., 2005).

Il faut enfin noter que les moyens d'activation intra-cytoplasmique des kinases JNKK hemipterous et JNK Basket sont nombreux. En effet, en plus de TAK1, 4 autres JNKKK sont identifiées à ce jour chez la drosophile. Il apparaît ainsi que l'activation finale des facteurs de transcription AP-1, résulte d'une intégration complexe de voies de signalisation différentes (Stronach, 2005).

4. Parallèle entre les voies IMD et JNK et la voie du TNFR1 des mammifères

Les mécanismes d'activation intra-cytoplasmique induits par la fixation du TNF- α sur ses récepteurs, dont le TNFR1, sont complexes et mon propos n'est pas ici de les décrire en détail. Je vais me limiter à une présentation simplifiée de cette voie, mettant en avant les protéines homologues aux voies IMD et JNK de la drosophile (Figure 4).

L'activation induite par la cytokine TNF- α est impliquée dans de nombreux processus comme l'inflammation, le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaire, et l'apoptose (Micheau and Tschopp, 2003). Il apparaît que cette activation requiert l'intervention séquentielle de deux complexes protéiques, en aval du TNFR1. Le complexe I formé par le recrutement de RIP1, TRAF2 et TRADD qui interagit à travers son Death Domain avec le TNFR1, permet l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 favorisant globalement les mécanismes de survie cellulaire. Dans ce premier complexe, on peut également trouver associées, des protéines permettant la modulation du signal comme les cIAP 1 et 2, et TRAF1. Le complexe II se forme avec le recrutement de FADD, des caspases 8 et 10 et le départ des protéines cIAP 1 et 2, et TRAF1. Ce deuxième complexe va activer les caspases effectrices du mécanisme d'apoptose (Micheau and Tschopp, 2003; Varfolomeev and Ashkenazi, 2004).

Il est intéressant de constater que la régulation négative mutuelle des voies IMD/NF- κ B et JNK/AP-1 est conservée chez les mammifères et se retrouve au sein de la voie d'activation du TNFR1. Ainsi, du fait que le facteur de transcription NF- κ B régule l'expression de gènes anti-apoptotiques comme les cAP ou c-FLIP, l'activation du complexe II ne peut aboutir à l'apoptose qu'en absence d'activité NF- κ B (Varfolomeev and Ashkenazi, 2004).

5. La voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) est activée par la fixation de ligands de type cytokine Unpaired (UPD1, 2 et 3) sur le récepteur Domeless (de la famille des récepteurs de cytokines de type I comme gp130). Le signal est transmis par la JAK Hopscotch jusqu'au facteur de transcription STAT Marelle (Agaisse and Perrimon, 2004).

Cette voie, conservée chez les mammifères, est impliquée dans la réponse antivirale de la drosophile (Dostert et al., 2005). La voie JAK/STAT permet également la régulation transcriptionnelle des gènes *tep* et des gènes de stress *totA* et *totM*. Il a été proposé que la transcription du gène *totA* dans les cellules du corps gras, en réponse aux infections bactériennes, soit régulée grâce à l'intégration de la signalisation NF- κ B Relish et du signal transmis par UPD3 (produit par les hémocytes) (Agaisse et al., 2003; Lagueux et al., 2000).

III. Motifs moléculaires microbiens et récepteurs de l'immunité innée

Un prérequis essentiel à l'activation du système immunitaire inné est la détection des microorganismes. Les MAMPs reconnus, sont comme je l'ai déjà dit, des molécules composées de motifs moléculaires très conservés. Les mêmes MAMPs sont ainsi utilisés assez largement par la plupart des eucaryotes pour l'activation de leur réponse immunitaire. Je vais décrire ici plus en détail le LPS, et surtout le PGN, qui nous intéresse plus particulièrement.

Les stratégies utilisées par les invertébrés et les mammifères pour détecter le même MAMP sont différentes. Ainsi, la détection du PGN s'effectue grâce à des récepteurs (PGRP et NOD) présentant des domaines protéiques de reconnaissance très différents. Je présenterai brièvement quelques PRRs de mammifères, puis ceux de la drosophile avec notamment la famille des PGRPs.

A. Exemples de motifs moléculaires microbiens (MAMPs)

Différentes molécules peuvent servir de MAMP pour le système immunitaire inné. Les MAMPs doivent être indispensables à l'intégrité structurelle ou fonctionnelle du microorganisme, et présenter un motif moléculaire conservé au cours de l'évolution. Parmi les MAMPs reconnus, on peut citer la flagelline de certaines bactéries, l'ADN non méthylé caractéristique des procaryotes et virus, le β -(1-3) glucane retrouvé dans la paroi de nombreux champignons, le LTA des bactéries à Gram-positif, et enfin le LPS et le PGN, que je vais décrire plus en détail.

1. Le LPS

Le Lipopolysaccharide (LPS) est le composant majeur de la couche externe de la paroi des bactéries à Gram-négatif (Figure 5). Cette molécule est formée de 3 parties : le Lipide A constitué de queues lipidiques, est rattaché à une région « cœur » très peu variable, elle-même composée de différents saccharides. La troisième partie appelée O-antigène est un polysaccharide qui présente une très forte variabilité d'une espèce bactérienne à l'autre. Chez les vertébrés, le LPS est connu comme étant un puissant inducteur de l'inflammation. Il est reconnu par TLR4, un récepteur de la famille des TLRs.

De nombreuses études utilisant du LPS « commercial » extrait à partir de parois bactériennes, indiquent que cette molécule induit une forte réponse immunitaire chez la drosophile. Cependant, il a maintenant été clairement démontré que le LPS n'est pas capable d'activer la réponse immunitaire de cet insecte. L'inducteur de la réponse induite est en fait du PGN « contaminant » présent dans ces préparations commerciales (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003).

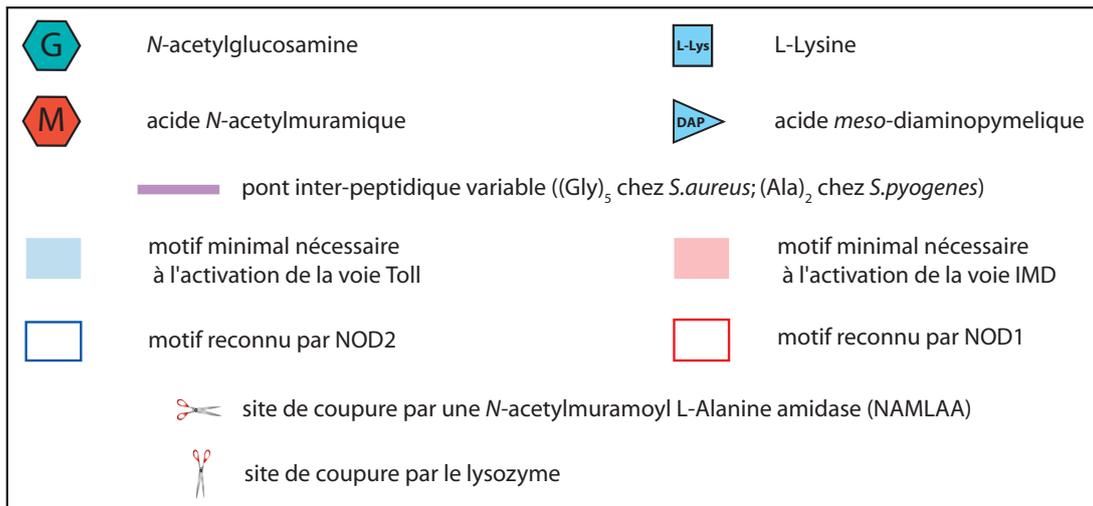
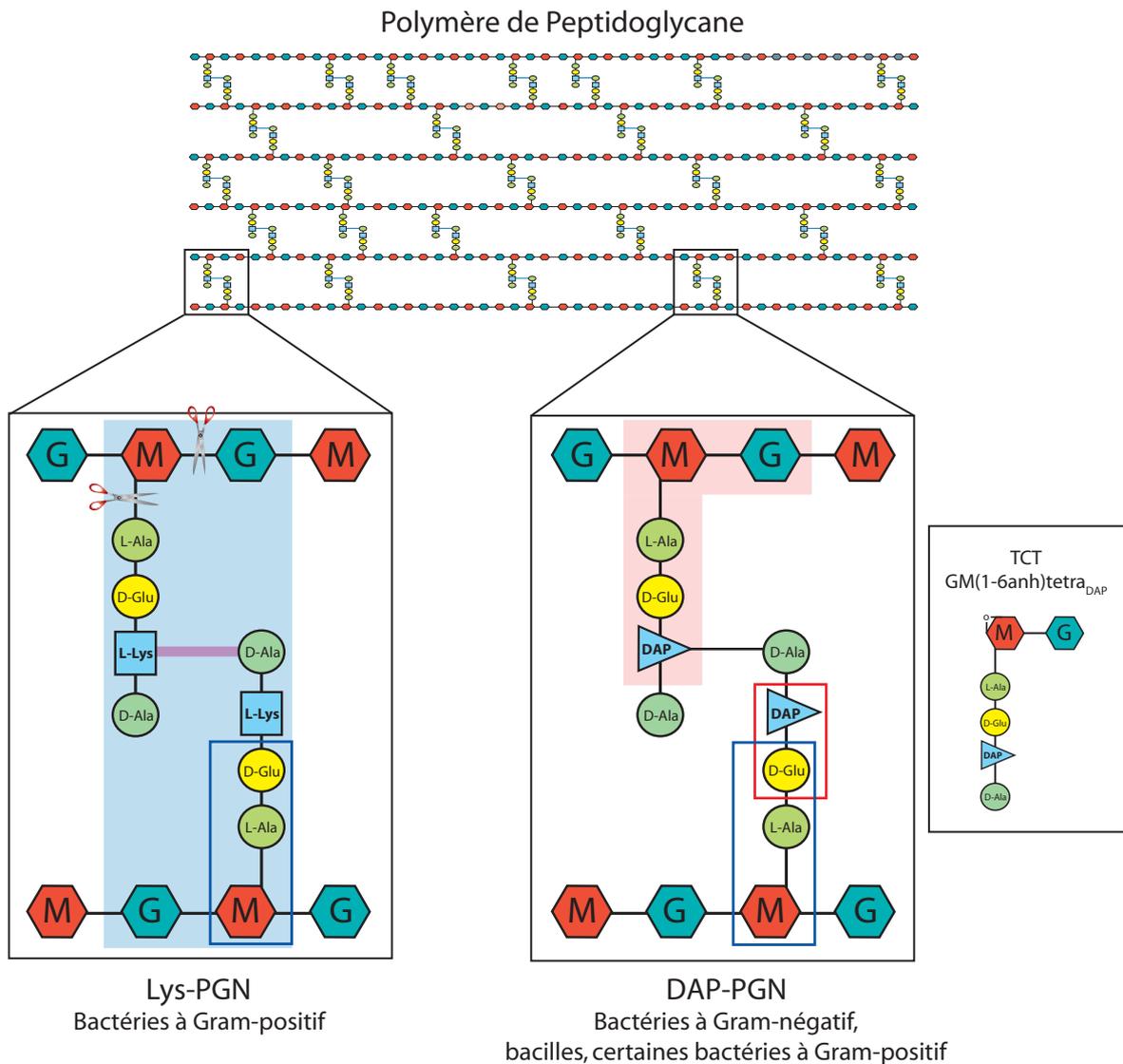


Figure 6. Représentation schématique de la structure du Peptidoglycane.

Présentation de la structure générale du peptidoglycane, et des différences entre Lys-PGN et DAP-PGN. Sont également représentés, les motifs moléculaires activateurs d'une réponse immunitaire chez la drosophile (voies Toll et IMD) et les mammifères (reconnaissance par NOD1 et NOD2) (voir texte).

2. Le PGN

Le PGN est une macromolécule présente dans la paroi de toutes les bactéries (Figure 5). Il joue un rôle fondamental dans le maintien de la forme et de la rigidité de la paroi du microorganisme, lui permettant de résister à la forte pression osmotique intra-cytoplasmique (Boneca, 2005). Chez les bactéries à Gram-positif la paroi est majoritairement composée de couches de PGN (jusqu'à 80). Chez les bactéries à Gram-négatif, la couche de PGN est beaucoup plus fine, et elle est située entre la membrane plasmique et la membrane externe constituée de LPS et de phospholipides (Figure 5).

Le PGN est un polymère composé de chaînes sucrées reliées entre elles par des ponts peptidiques. Les chaînes sucrées sont invariablement formées d'enchaînements de dissaccharides *N*-acétylglucosamine (GlcNac)(G) et acide *N*-acétylmuramique (MurNac)(M). Les ponts peptidiques sont reliés au groupe lactyl du MurNac par la L-alanine du peptide souche (L-Alanine - □-D-Glutamate - X - D-Alanine) (Figure 6).

La première variante entre les différents types de PGN est la nature de l'acide aminé X qui est toujours un acide possédant deux groupes amino. Différents acides aminés peuvent être trouvés à cette position comme la L-ornithine, le L,L ou D,D acide diaminopymélique. Néanmoins, chez la très grande majorité des espèces bactériennes l'acide aminé X est soit une L-Lysine (L-Lys) soit un acide *meso*-diaminopymélique (*meso*DAP). On distingue donc 2 principaux types de PGN, le Lys-PGN et le DAP-PGN. Le Lys-PGN ne se retrouve que chez des bactéries à Gram-positif, alors que le DAP-PGN est présent dans la paroi de presque toutes les bactéries à Gram-négatif, les bacilles ainsi que chez certaines autres bactéries à Gram-positif (Schleifer and Kandelr, 1972).

Un deuxième élément variable de la structure de PGN est propre au Lys-PGN des bactéries à Gram-positif. Il s'agit de la nature du pont inter-peptidique reliant la L-Lys et la D-Ala de deux peptides souches différents. On trouve selon les espèces de bactéries à Gram-positif des ponts inter-peptidiques de tailles et de compositions en acides aminés différentes. Le pont inter-peptidique du Lys-PGN de *S. aureus* est par exemple composé de 5 Glycines alors que celui de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) n'est composé que de 2 Alanines. Dans le DAP-PGN, la liaison entre le *meso*DAP et la D-Ala est directe chez toutes les espèces de bactéries à Gram-négatif et de bacilles. Il apparaît ainsi que les Lys-PGN forment un groupe structurellement plus hétérogène que celui formé par les DAP-PGN.

La présence dans la composition du PGN du MurNac, un sucre n'existant que chez les procaryotes, et d'acides aminés en orientation D qui sont rarement rencontrés chez les eucaryotes, font de cette molécule un candidat idéal pour jouer le rôle de MAMP. De plus, les variations de structure rencontrées selon le type de bactérie, permettent une détection plus spécifique et une réponse plus adaptée.

On peut cependant se poser la question de l'accessibilité du PGN à d'éventuels PRRs du système immunitaire d'un hôte infecté. Si le PGN des bactéries à Gram-positif est directement accessible, celui des bactéries à Gram-négatif est placé sous la couche de LPS, et est de surcroît en quantité plus réduite. Il est alors intéressant de souligner que la majorité des bactéries à Gram-négatif renouvellent, au cours des phases de croissance exponentielle, jusqu'à 50% de leur PGN à chaque division. Cependant, à chaque cycle une partie de ce PGN recyclé (par exemple 5% pour *E. coli*) est perdu par la bactérie et libéré dans le milieu environnant (Park, 1995).

Un des produits majoritaires de dégradation de ce recyclage est le GM(anh)-tetra_{DAP}, aussi connue sous le nom de TCT (Tracheal Cyto Toxin), qui comporte une liaison (1-6)anhydre sur le MurNac (Figure 6). Pour certaines bactéries comme *Bordetella pertussis* et *Neisseria gonorrhoeae*, le TCT agit comme facteur de virulence en causant, notamment chez les vertébrés, des dommages aux cellules des épithéliums ciliés (Boneca, 2005). Chez la drosophile, Le TCT est un très bon inducteur de la voie IMD. Il a d'autre part été démontré que la structure minimale de DAP-PGN permettant l'activation de la voie IMD est le GM(anh)-tri_{DAP} (cf. Introduction.V).

En ce qui concerne le Lys-PGN, il apparaît que la structure minimale permettant le déclenchement de la voie Toll est un dimère de tetra-peptide, relié par le pont inter-peptidique (cf Introduction V).

Parmi les nombreuses enzymes utilisées par la bactérie au cours du recyclage de son PGN, certaines possèdent des homologues chez des virus ou chez des eucaryotes. C'est notamment le cas de AmpD, une *N*-acetylmuramoyl L-alanine amidase (NAMLAA) qui permet de couper la liaison amide entre la L-Ala du peptide souche et le MurNac. On retrouve cette activité catalytique NAMLAA chez le lysozyme du bactériophage T7 ainsi que chez certains PGRPs (cf. Introduction.IV).

B. Quelques récepteurs de l'immunité innée

Il existe de nombreuses familles de PRRs chez les eucaryotes. Je ne parlerai ici que des familles de récepteurs ayant été, ou étant impliqués dans la reconnaissance du PGN.

1. Les TLRs

Les Toll Like Receptors représentent la principale famille de PRRs chez les mammifères. 10 TLRs sont décrits chez l'Homme et tous sont des récepteurs membranaires. Ils sont localisés soit à la membrane cytoplasmique, soit dans la membrane d'endosomes intracellulaires des macrophages et cellules dendritiques. Comme dans le récepteur Toll de drosophile, leur partie intracellulaire est un domaine TIR, et leur domaine extra-cytoplasmique contient des régions variables riches en Leucine (LRR). Ces domaines LRR sont impliqués dans la reconnaissance de différents MAMPs, avec dans certains cas la participation de cofacteurs. Par exemple la reconnaissance du LPS est assurée par TLR4 avec les co-récepteurs CD14 et MD-2. Dans certains cas 2 TLRs peuvent hétérodimériser pour la reconnaissance d'un motif microbien. C'est par exemple le cas de TLR1 et TLR2 ou TLR2 et TLR6 pour la reconnaissance des lipopeptides. Enfin, certains autres agissent seuls comme TLR5 qui reconnaît la flagelline.

TLR2 a été considéré dans un premier temps comme récepteur du PGN. Cependant, il est maintenant établi que ni TLR2, ni TLR2/TLR1, ni TLR2/TLR6, ne reconnaissent le PGN. Il semblerait que TLR2 soit plutôt impliqué dans la détection des lipoprotéines et du LTA (Travassos et al., 2004).

Les TLRs exprimés par les cellules dendritiques du système immunitaire jouent un rôle important dans la communication entre système inné et système adaptatif (Takeda and Akira, 2005).

2. Les protéines NOD1 et NOD2

Les protéines NOD1 et NOD2 de mammifères font partie de la famille des NOD-LRR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain - Leucine Rich Repeat). Elles disposent d'un domaine LRR similaire à celui de Toll et des TLRs, qui leur permet de lier des fragments de PGN. Il a en effet été démontré que NOD1 reconnaît le dipeptide (D-Glu - *meso*DAP) présent chez les bactéries à Gram-négatif, alors que NOD2 est un récepteur plus général du PGN en

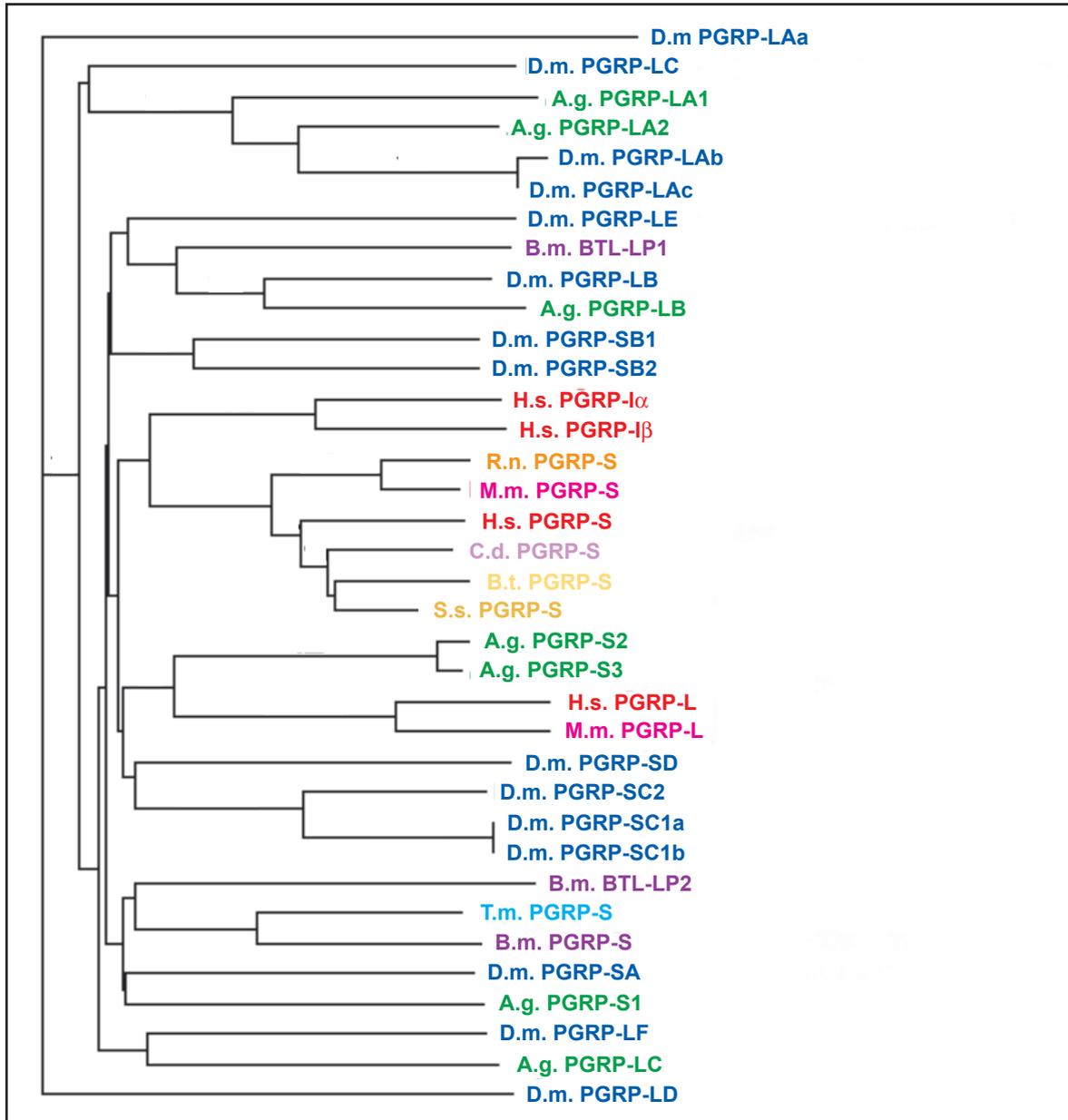
déTECTANT le muramyl dipeptide (MurNac - L-Ala - D-Glu) (Figure 6) (Girardin et al., 2003a; Girardin et al., 2003b).

NOD1 et NOD2 sont présents dans le cytoplasme de cellules très exposées aux microorganismes – les cellules APC (présentatrices de l'antigène) et les cellules épithéliales comme celles de l'intestin. L'activation de NOD1 et NOD2 permet, comme celle des TLRs, la transcription de gènes de l'inflammation, sous le contrôle de facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Des mutations de *Nod2* sont d'ailleurs associées chez l'Homme, à la maladie de Crohn, une pathologie inflammatoire chronique de l'intestin (Philpott and Girardin, 2004; Strober et al., 2006).

3. Les GNBP

Il existe 3 gènes codant pour des GNBP/ – GRP (Gram-Negative Binding Protein/ – Glucan Recognition Protein) dans le génome de la drosophile. Les GNBP sont des protéines contenant un domaine N-terminal de liaison au – glucane et un domaine C-terminal qui présente des homologies avec des glucanases bactériennes, sans en avoir a priori l'activité catalytique (Zhang et al., 2003). Les GNBP ont été mises en évidence dans un premier temps chez le ver à soie *Bombyx mori* pour leur capacité à fixer les bactéries à Gram-négatif et le –(1,3)glucane des levures (Lee et al., 1996). De façon surprenante, la caractérisation du mutant *GNBP-I^{osi}* de drosophile indique que GNBP-1 est important, avec PGRP-SA dans la détection des bactéries à Gram-positif et l'activation de la voie Toll, en amont de Spätzle (Gobert et al., 2003). S'il est établi que PGRP-SA et GNBP-1 forment un complexe et que PGRP-SA reconnaît directement le PGN de ces bactéries, le rôle exact de GNBP-1 n'est pour l'instant pas clairement déterminé.

Chez la drosophile, la reconnaissance du PGN est assurée par une famille de protéines, les PGRPs, que je vais maintenant présenter.



d'après Dziarski R. *Mol. Immunol.* 2003

Figure 7. Arbre phylogénétique des PGRPs de mammifères et d'insectes.

Mammifères: H.s. *Homo sapiens* (homme); M.m. *Mus musculus* (souris); R.n. *Rattus norvegicus* (rat); S.s. *Sus scrofa* (cochon); C.d. *Camelus dromedarius* (dromadaire); B.t. *Bos taurus* (vache).

Insectes: D.m. *Drosophila melanogaster* (mouche); A.g. *Anopheles gambia* (moustique); B.m. *Bombyx mori* (ver à soie); T.n. *Trichoplusia ni* (papillon).

IV. LES PGRPs

C'est dans l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori* que le premier PGRP a été mis en évidence pour sa capacité à lier le PGN (Yoshida et al., 1996). Les PGRPs sont présents chez de nombreuses autres espèces, et forment ainsi une famille de protéines conservées des insectes aux mammifères (Figure 7). La caractéristique commune à toutes ces protéines est la présence d'un domaine PGRP, potentiellement capable de lier le PGN.

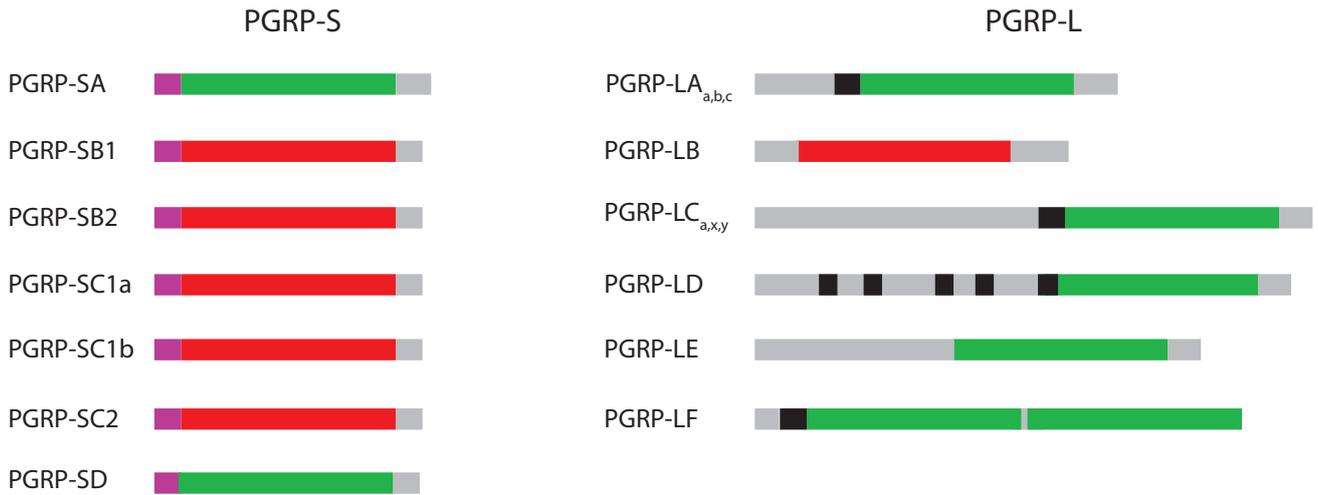
A. Les PGRPs de drosophile

Comme tous les PGRPs, ceux de drosophile contiennent le domaine protéique PGRP, d'environ 160 acides aminés, qui présente une forte homologie de séquence avec le domaine catalytique du lysozyme du phage T7, une *N*-acétylmuramoyl-L-alanine amidase (NAMLAA). La famille des PGRPs de drosophile est constituée de 13 gènes codant au moins 17 isoformes différentes (Dziarski, 2004; Werner et al., 2000). Pour sa nomenclature, cette famille a été subdivisée en PGRPs courts «PGRP-S» et PGRPs longs «PGRP-L» en fonction de la taille de leur transcrit. On dénombre ainsi 7 gènes codant des PGRP-S d'une taille de 180 à 200 acides aminés, et 6 gènes codant des PGRP-L d'une taille de 215 à 500 acides aminés (Figure 8.A). Tous les PGRP-S possèdent dans leur partie N-terminale, un peptide signal, suggérant que ces protéines sont secrétées dans l'hémolymphe. Certains possèdent également un ou plusieurs domaines fortement hydrophobes, indiquant une probable localisation membranaire (PGRP-LA, -LC, -LD, -LF).

Cette classification ne reflète cependant aucunement, ni les différentes potentialités fonctionnelles, ni la localisation de ces différentes protéines. Il est donc intéressant de proposer une deuxième présentation tenant mieux compte de ces critères (Figure 8.B). On peut alors distinguer les PGRPs ayant conservé les acides aminés essentiels à l'activité catalytique NAMLAA du lysozyme T7, et les PGRPs ayant perdu cette fonction enzymatique (Mellroth et al., 2003)(cf. Introduction.V).

La plupart des PGRPs sont exprimés dans le corps gras, et leur expression est induite par une infection. Certains PGRP-S sont exprimés dans le tube digestif, où ils sont potentiellement secrétés (Werner et al., 2000). Les PGRPs de drosophile, ayant déjà été caractérisés *in vivo*, sont tous des PGRPs sans activité catalytique qui jouent un rôle de récepteur du PGN.

A.



B.

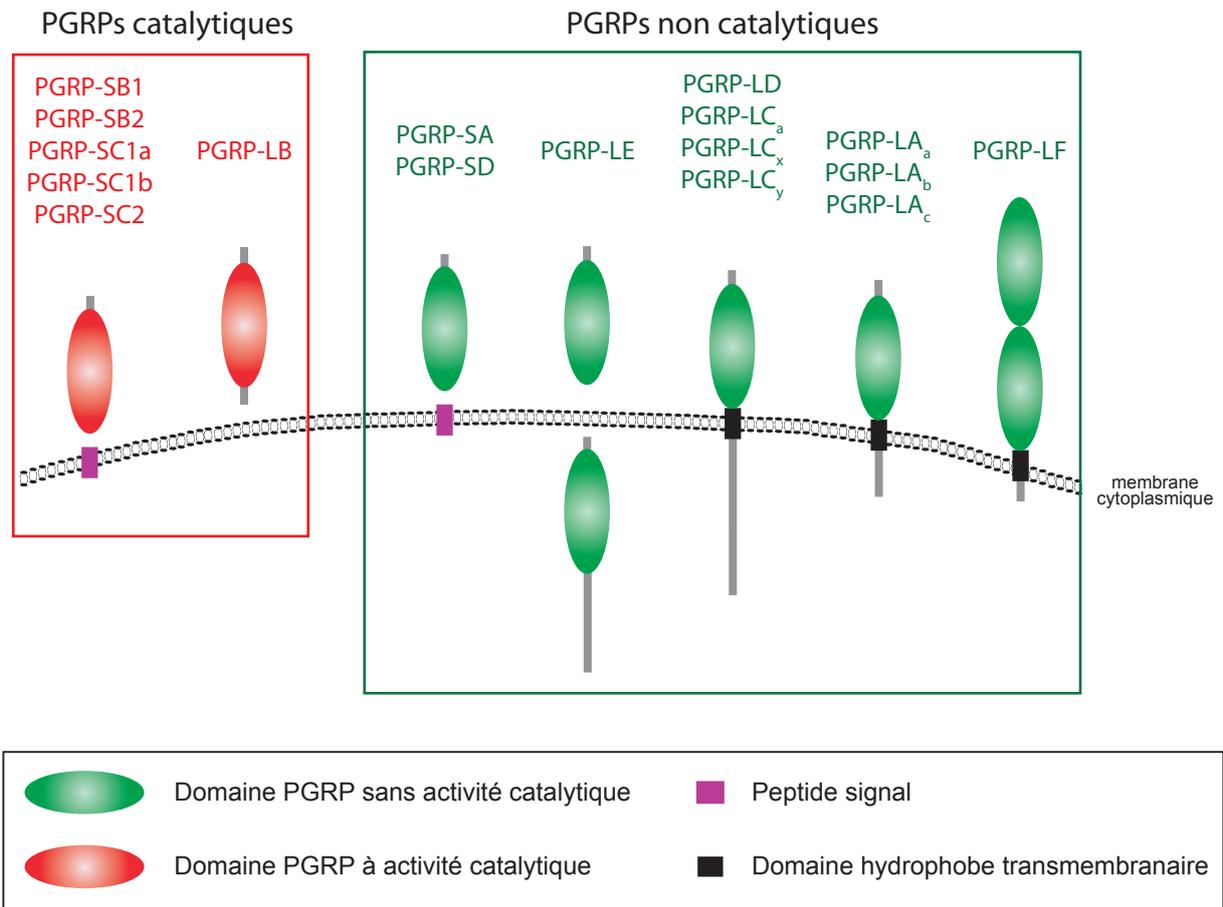


Figure 8. Famille des PGRPs de drosophile.

A. Classification selon la taille des transcripts.

B. Classification en fonction de l'activité catalytique *N*-actetylmuramoyl-L-alanine amidase.
(voie texte)

- **PGRP-SA** est le premier PRR de drosophile à avoir été caractérisé pour son rôle dans la reconnaissance du PGN des bactéries à Gram-positif (Michel et al., 2001). Ainsi le mutant *PGRP-SA^{seml}* (*semmelweis*) présente une forte susceptibilité à différentes infections par des bactéries à Gram-positif, ainsi qu'un blocage partiel ou total de l'induction de la voie Toll. PGRP-SA est sécrété par les cellules du corps gras et agit dans l'hémolymphe, en amont de Spätzle. PGRP-SA n'a pas de fonction dans la reconnaissance des champignons et des bactéries à Gram-négatif.

- **PGRP-LC** est transmembranaire et est le principal PRR permettant la reconnaissance du PGN des bactéries à Gram-négatif et des bacilles. PGRP-LC permet également la transmission du signal de reconnaissance en activant la voie IMD (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002). Le mutant *PGRP-LC^{E12}* présente ainsi une forte sensibilité aux infections par des bactéries à Gram-négatif. Il existe 3 isoformes de PGRP-LC (a,x et y), qui disposent chacune, d'un domaine PGRP propre, et qui présentent des rôles différents vis-à-vis de la reconnaissance du PGN (cf. Introduction.V). Il a également été démontré que PGRP-LC interagit directement, via son domaine intra-cytoplasmique avec IMD, et fonctionne comme récepteur de cette voie (Choe KM, 2005). Différentes études indiquent que l'activation de PGRP-LC implique son homo ou hétérodimérisation (Mellroth et al., 2005).

- **PGRP-LE** ne possède ni peptide signal ni domaine transmembranaire. Sa surexpression induit la synthèse de diptéricine et l'activation de la cascade de mélanisation (Takehana et al., 2002). Une analyse complémentaire a montré que PGRP-LE agit en synergie avec PGRP-LC dans la reconnaissance du PGN et l'activation de la voie IMD (Takehana et al., 2004). Une étude récente indique que l'on peut trouver PGRP-LE sous 2 formes □ la forme entière est vraisemblablement intra-cytoplasmique et agirait comme récepteur du TCT présent à l'intérieur de la cellule, alors qu'une forme extracellulaire, constituée seulement par le domaine PGRP, servirait de co-récepteur à PGRP-LC_x pour la reconnaissance du TCT présent dans l'hémolymphe (Kaneko et al., 2006).

- **PGRP-SC1b** n'a fait l'objet que d'une caractérisation *in vitro* (Mellroth et al., 2003). Ce travail démontre que la protéine recombinante PGRP-SC1b a une activité NAMLAA vis-à-vis du Lys-PGN et du DAP-PGN. De plus il semble que le PGN, une fois coupé par PGRP-

SC1b, perde son aptitude à stimuler la voie IMD. Cette étude indique que les PGRPs catalytiques ne sont donc pas des récepteurs du PGN capables d'activer les voies immunitaires.

B. Les PGRPs de mammifères

De nombreux PGRPs de mammifères ont été caractérisés grâce à la recherche d'homologues des PGRPs d'insectes (Kang et al., 1998). Chez l'Homme et la souris, il existe 4 PGRPs : PGRP-S, PGRP-L, PGRP-I α et PGRP-I β (Dziarski, 2004). On retrouve également certains de ces PGRPs chez d'autres mammifères.

- **PGRP-S** est majoritairement exprimée dans les cellules de la moelle osseuse ainsi que les neutrophiles (où elle est localisée au niveau des granules intra-cytoplasmiques). PGRP-S est capable de se lier au PGN, et présente une activité bactériostatique *in vitro* envers certaines bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif comme *S. aureus* et *E. coli* (Cho et al., 2005). Des souris mutantes pour PGRP-S présentent une susceptibilité accrue aux infections intra-péritonéales par des bactéries à Gram-positif faiblement pathogènes. Ce phénotype semble lié à leur incapacité à éliminer les bactéries faiblement virulentes présentes à proximité et dans les neutrophiles. La résistance de ces souris *PGRP-S*^{-/-} aux infections par des bactéries à Gram-positif ou négatif pathogènes est par contre normale. D'autre part, PGRP-S ne semble pas jouer de rôle dans l'induction des cytokines TNF- α et IL-6 suite à l'infection (Dziarski et al., 2003).

Un travail récent indique que la PGRP-S de bovin présente également une activité bactéricide, et qu'elle est capable, en plus du PGN, de se lier au LTA et au LPS (Tydell et al., 2006).

- **PGRP-I α** et **PGRP-I β** sont des PGRPs potentiellement membranaires, contenant comme PGRP-LF de drosophile 2 domaines PGRPs extracellulaires et un domaine intra-cytoplasmique très court. Ces 2 protéines sont exprimées par de nombreux types de cellules épithéliales directement en contact avec les microorganismes. Une étude récente démontre que les PGRP-I α et PGRP-I β humaines sont secrétées et ont une activité bactéricide contre les bactéries à Gram-positif et une activité bactériostatique contre une grande variété de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Il est proposé que l'activité antibactérienne de ces PGRPs

est liée à leur capacité à lier avec une forte affinité le PGN, et à interférer dans le renouvellement de leur paroi (Lu et al., 2006).

- **PGRP-L** est une protéine potentiellement membranaire. Elle est notamment exprimée par les cellules du foie, et son domaine PGRP possède une activité catalytique NAMLAA. Il semble que PGRP-L puisse également être sécrétée et retrouvée dans le sérum. Ainsi, l'activité NAMLAA détectée depuis le début des années 80 dans le sérum humain, pourrait en partie être attribuée à PGRP-L (Dziarski, 2004; Gelius et al., 2003). L'analyse de souris mutantes *PGRP-L^{-/-}*, indique que l'absence de cette protéine n'affecte que très peu l'induction des cytokines, et pas du tout la susceptibilité aux infections (Xu et al., 2004).

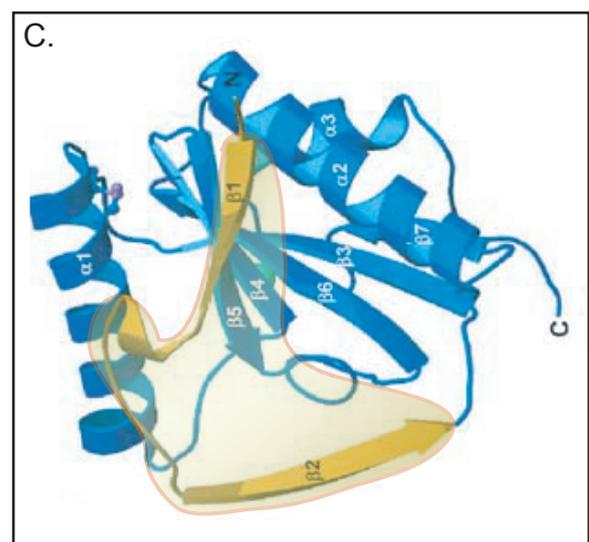
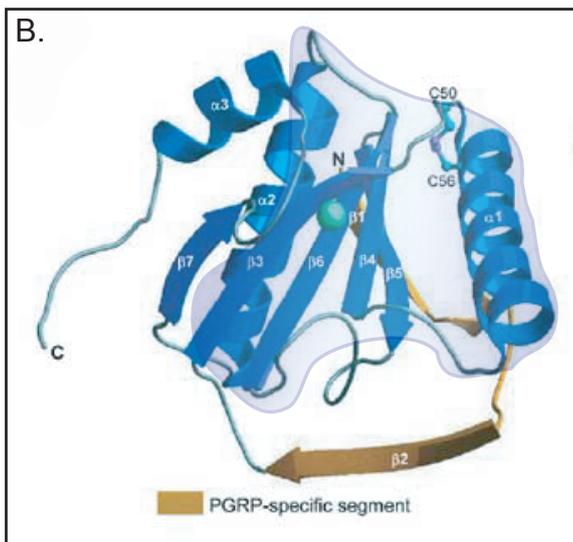
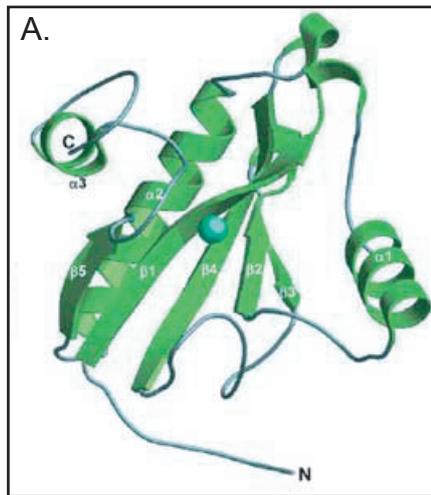
Un travail sur des cellules intestinales de porc indique que 2 isoformes de PGRP-L (L1 et L2) qui ont tous les deux une activité catalytique, sont impliquées dans la régulation de la β -defensine-1 suite à une infection par la bactérie *Lysteria monocytogenes* (Sang et al., 2005).

V. Bases moléculaires de la reconnaissance PGRP/PGN

L'importance croissante des travaux sur le rôle des PRRs dans les processus de l'immunité innée, a incité certaines équipes à étudier la structure tridimensionnelle de ces protéines, et notamment celle des PGRPs. Effectivement, la connaissance de leur structure tridimensionnelle constitue un prérequis essentiel à une bonne compréhension des mécanismes biochimiques de l'interaction entre les PGRPs et le PGN.

A. Structure tridimensionnelle des PGRPs

La très grande similarité des séquences en acides aminés des PGRPs et du lysozyme du phage T7 permettait de prédire que leurs structures tertiaires seraient comparables. La résolution des structures cristallines des PGRP-LB, PGRP-SA et PGRP-LC_a de drosophile ainsi que celles des PGRP-I β et PGRP-S humaines (Chang et al., 2005; Chang et al., 2004; Guan et al., 2004a; Guan et al., 2005; Kim et al., 2003; Reiser et al., 2004) a permis de confirmer que leurs structures sont effectivement très proches de celle du lysozyme du phage T7 (Cheng et al., 1994) (Figures 9, 10). Ces différents travaux ont permis d'apporter un certain nombre d'informations très intéressantes sur l'ensemble des PGRPs:



d'après Kim M-S et al., *Nat. Immunol.* 2003

Figure 9. Structure comparée du lysozyme du bactériophage T7 et d'un PGRP (PGRP-LB).

La comparaison des diagrammes de ribbon du lysozyme du bactériophage T7 (A) et de PGRP-LB (B,C) permet de constater la grande similitude des structures tertiaires de ces deux protéines. Le sillon de reconnaissance du PGN est surligné en bleu pâle (B). Une différence notable est la présence chez PGRP-LB comme chez tous les autres PGRPs, d'un segment spécifique composé de deux feuillettes β représentés en jaune. Comme le lysozyme T7, PGRP-LB ainsi que tous les PGRPs potentiellement amidases, possèdent un site catalytique permettant de lier un ion zinc (sphère verte). En (C) on peut voir la face de PGRP-LB, où le sillon spécifique des PGRPs est surligné en jaune pâle.

- Les domaines PGRP présentent une forme globulaire qui possède deux sillons disposés de part et d'autre de la protéine.

- Le domaine PGRP est constitué de 3 hélices α et d'un feuillet β central, composé lui de 4 brins β . Cette structure induit la formation d'un sillon permettant la liaison au PGN. Ce sillon est constitué d'un plancher formé par le feuillet β et de flancs composés par une hélice α d'une part, et de différentes boucles (4 à 5) d'autre part (Figure 9).

- La partie N-terminale des PGRPs (deux feuillets β et une boucle) présente une structure formant également un sillon, placé à l'opposé du sillon de reconnaissance du PGN, et totalement absent chez le lysozyme du phage T7. Ce sillon dont les résidus, conservés chez tous les PGRPs, sont hydrophobes, représente un domaine potentiel d'interaction protéine-protéine qui pourrait avoir un rôle dans la transmission en aval du signal de liaison au PGN (Figure 9, 10).

- Les PGRPs ayant une activité catalytique comme PGRP-LB disposent dans le fond du sillon de reconnaissance du PGN, d'un site catalytique caractérisé par la présence de deux histidines et une cystéine permettant de lier un ion zinc (Figure 9, 10).

B. Interaction entre PGRP et PGN

La connaissance de la structure tridimensionnelle des PGRPs a permis de prévoir quels étaient les domaines de ces protéines impliqués dans la reconnaissance du PGN. Cependant, seules des informations sur l'interaction directe entre les PGRPs et le PGN (co-cristallisation et mesure d'affinité, associées à une étude *in vivo* de cette reconnaissance) ont permis de mieux comprendre les modalités biochimiques de cette reconnaissance. Il est ici important de distinguer clairement les motifs moléculaires minimaux nécessaires à la reconnaissance par les PGRPs, et les motifs moléculaires minimaux nécessaires à l'activation des voies Toll ou IMD.

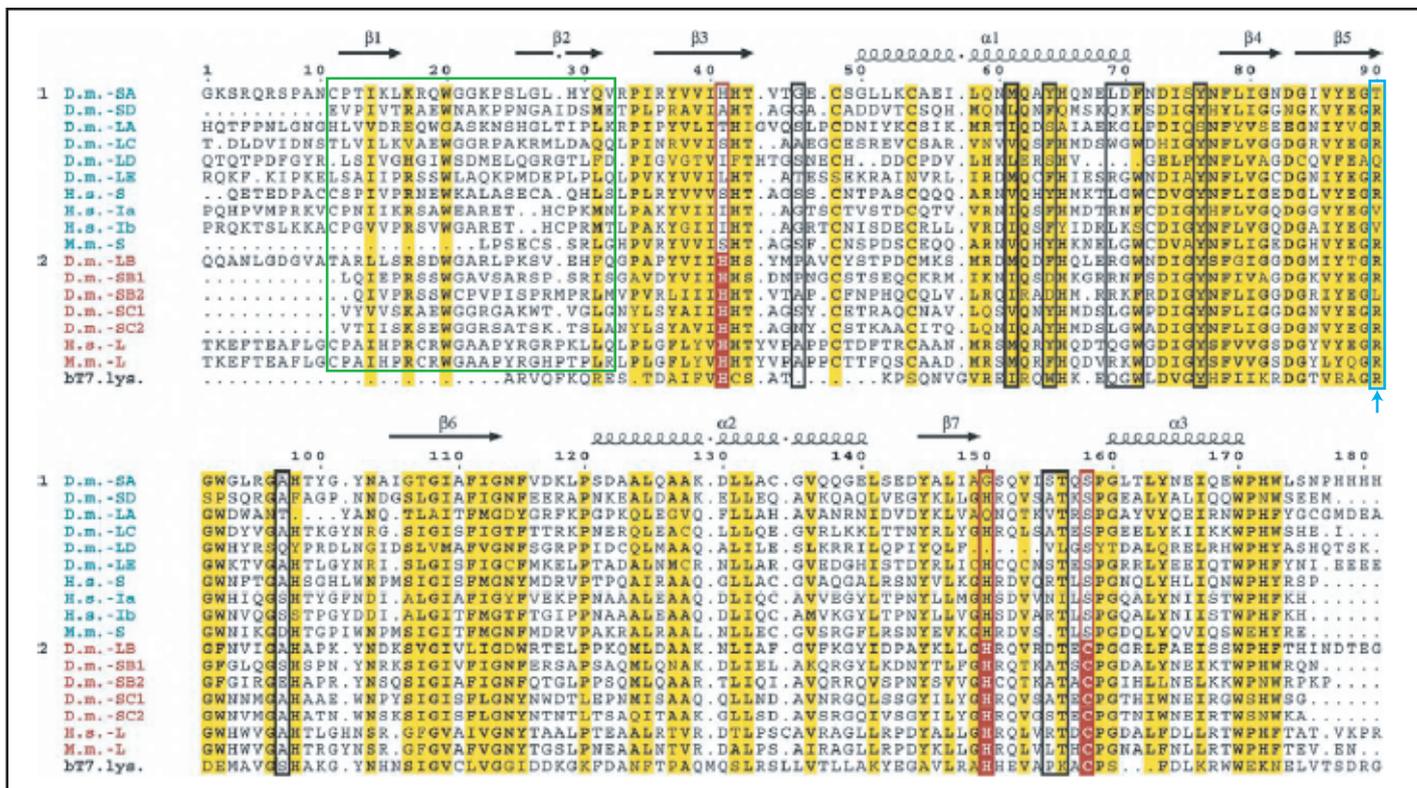
1. Données biochimiques et structurales

En ce qui concerne la reconnaissance du Lys-PGN, différentes études semblent indiquer que le motif minimal de Lys-PGN reconnu est un muramyl tripeptide (M-tri_{Lys}). Cependant, la présence d'un quatrième acide aminé dans le peptide souche (M-tetra_{Lys}) permet une interaction plus forte avec le PGRP (Guan et al., 2004b; Kumar et al., 2005). Ces données de co-cristallisation ainsi que des travaux établissant des mesures d'affinité, indiquent que c'est très vraisemblablement sous forme d'un dimère (M-tetra_{Lys} □ M-tetra_{Lys}) que le Lys-PGN est reconnu. Cette reconnaissance impliquerait alors l'intervention de 2 PGRPs, induisant probablement la formation d'un dimère de récepteurs (Swaminathan et al., 2006).

D'autres travaux se sont intéressés à la reconnaissance du DAP-PGN, et notamment à l'interaction entre PGRP-LC ou PGRP-LE, et la cytotoxine trachéale (TCT ou GM(anh)-tetra_{DAP}). Ces études ont permis d'établir les bases de la reconnaissance du DAP-PGN par les PGRPs.

Dans une étude sur les différentes isoformes de PGRP-LC, Mellroth et collaborateurs démontrent que PGRP-LC_x lie le PGN monomérique et le TCT, que PGRP-LC_a ne lie aucune de ces molécules, et que l'hétérodimérisation de PGRP-LC_x et PGRP-LC_a est spécifiquement induite par la présence de TCT (Mellroth et al., 2005). La co-cristallisation de PGRP-LC_a, PGRP-LC_x et du TCT indique que PGRP-LC_x se lie au monomère de PGN, qu'il présente ensuite à PGRP-LC_a. Il apparaît que la présence de la liaison anhydre (1,6)anh au sein du sucre GlcNac est essentielle à la reconnaissance du TCT, ainsi qu'à la dimérisation des domaines PGRP (Chang et al., 2006). Les auteurs proposent un modèle dans lequel, la reconnaissance du TCT par PGRP-LC se fait en deux temps. PGRP-LC_x reconnaît d'abord le TCT, la présence du *meso*DAP étant essentiel à la liaison. Dans un deuxième temps, le TCT est présenté à PGRP-LC_a, qui interagit avec la partie sucrée (GM(anh)), ce qui permet l'hétérodimérisation des deux domaines PGRP. Cela permet probablement la dimérisation des domaines intra-cytoplasmiques et l'activation de la voie IMD. Dans le cas de la reconnaissance d'un dimère (GM-tetra_{DAP} □ GM-tetra_{DAP}), il est proposé que seul PGRP-LC_x soit impliqué et qu'il forme alors un homodimère (Chang et al., 2006; Chang et al., 2005; Mellroth et al., 2005).

Il a d'autre part été montré que PGRP-LE reconnaît également le TCT. Cette reconnaissance se ferait de façon assez analogue que pour PGRP-LC_x et PGRP-LC_a si ce n'est



d'après Reiser J-B et al., *J. Mol. Biol.* 2004

Figure 10. Alignement des séquences en acides aminés de différents domaines PGRPs.

En bleu (groupe 1) sont présentées les séquences des PGRPs non catalytiques et en rouge (groupe 2), les PGRPs pouvant avoir une activité enzymatique. Toutes ces séquences sont comparées à celle du lysozyme du bactériophage T7 (en noir). La structure secondaire (correspondant ici à celle de PGRP-SA) est représentée au dessus des alignements. Les acides aminés des domaines présentant plus de 70% d'homologie sont surlignés de jaune. Les trois encadrés rouges indiquent les trois acides aminés essentiels à la formation du site catalytique de liaison au zinc. Les encadrés noirs représentent les acides aminés bordant le sillon de reconnaissance du PGN. Enfin, dans l'encadré vert sont représentés les acides aminés formant la structure N-terminale propre aux PGRPs et absente chez le lysozyme. A la position 90 (encadré bleu), on trouve un des acides aminés impliqués dans la discrimination en Lys-PGN et DAP-PGN. Ainsi, pour tous les PGRPs connus comme étant capables de se lier au DAP-PGN, il s'agit d'une arginine (R).

que PGRP-LE qui est structurellement proche de PGRP-LC_x, reconnaît à la fois le tetrapeptide (tetra_{DAP}) d'un monomère TCT et le disaccharide (GM(anh)) d'une autre molécule de TCT. Ceci semble alors entraîner une multimérisation de nombreuses molécules de PGRP-LE placées tête-bêche les unes par rapport aux autres (Lim et al., 2006).

Ces différentes études ont permis de déterminer deux éléments clef de la discrimination entre Lys-PGN et DAP-PGN

- Certains acides aminés au sein du sillon de reconnaissance du PGN semblent être essentiels à la reconnaissance spécifique de la Lysine ou de l'acide *meso*DAP. Il est intéressant de noter que la moitié des résidus aminés du domaine PGRP interagissant avec le PGN, et notamment ceux en contact avec la L-lysine ou le DAP, présentent une grande variabilité au sein des PGRPs. Parmi ces acides aminés, 2 sont néanmoins conservés selon qu'il s'agit de PGRP reconnaissant le DAP-PGN ou le Lys-PGN (c'est notamment le cas d'une arginine présente chez tous les PGRPs reconnaissant le DAP-PGN) (Figure 10). La variabilité des autres acides aminés peut permettre d'expliquer les différences d'affinités existant entre différents PGRPs vis-à-vis d'un même PGN (Figure 10).

- Un deuxième aspect de la discrimination entre Lys-PGN et DAP-PGN monomériques semble être la présence d'une liaison anhydre au sein du MurNac, que l'on ne trouve que chez les bactéries à Gram-négatif

Enfin, deux éléments pourraient permettre d'expliquer les différences d'affinité observées ou supposées, entre un PGRP donné et différents PGNS du même type mais provenant d'espèces différentes de bactéries

- A nouveau, la variabilité des acides aminés du PGRP en contact avec le PGN dans le sillon de reconnaissance peut être évoquée.

- le nombre, ainsi que la nature des acides aminés du pont inter-peptidique ont également été proposés comme jouant un rôle dans l'affinité entre PGRP et Lys-PGN.

2. Données physiologiques

Tous les résultats que je viens de présenter ne prennent pas en compte la capacité de ces résidus de PGN à induire les voies immunitaires mais uniquement leur aptitude à être reconnus par les PGRPs. Ainsi, des approches plus «physiologiques» ont permis de confirmer et d'affiner les informations apportées par les études biochimiques.

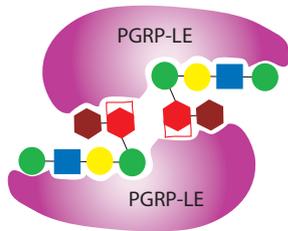
Le premier travail ayant permis de déterminer de façon claire les modalités d'activation des voies Toll et IMD en fonction du type de PGN, a été publié en 2003. Il est clairement démontré que la synthèse de diptéricine est induite sous le contrôle de la voie IMD, en réponse à la présence de PGN de type DAP. D'autre part il est également démontré que la voie Toll permet la régulation transcriptionnelle de la *drosomycine*, en réponse à la présence de PGN de type Lys (Leulier et al., 2003).

L'utilisation de différentes molécules dérivées du DAP-PGN de *E. coli*, a permis de déterminer que la voie IMD est activée par une structure minimale correspondant à un monomère GM(anh)-tri_{DAP} et que la liaison anhydre du MurNac est nécessaire à la reconnaissance du PGN et à l'induction de la réponse immunitaire. Cette liaison anhydre stabilise le sucre dans une conformation fixe, ce qui permet son interaction avec le domaine PGRP et donc sa reconnaissance. Il est notable que cette liaison anhydre n'est obtenue que chez les bactéries à Gram-négatif qui, lors du recyclage de leur PGN, libèrent par l'action d'une enzyme propre à ce type de bactérie (une transglycolase), des monomères présentant cette conformation. Il avait ainsi été prédit que les bactéries à Gram-positif ne générant pas cette liaison anhydre, le motif minimal de Lys-PGN permettant d'activer une réponse immunitaire ne pourrait être que polymérique, une structure dans laquelle le MurNac a une conformation stable (Stenbak et al., 2004).

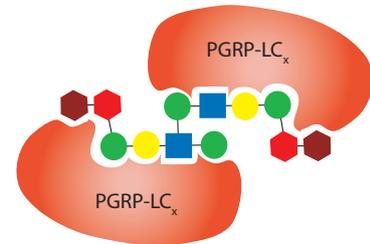
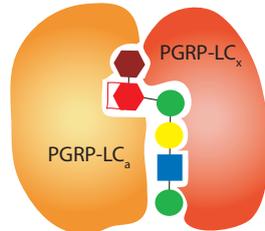
Une étude complémentaire a également permis de confirmer que l'activation de la voie IMD par le TCT nécessite l'intervention de PGRP-LC_a et PGRP-LC_x, alors qu'un polymère de DAP-PGN ne requiert que l'isoforme x. Cette reconnaissance induit dans les deux cas une dimérisation du récepteur PGRP-LC (Kaneko et al., 2004).

Un travail sur la reconnaissance du PGN de type Lys a confirmé *in vivo* l'hypothèse formulée par l'étude de Stenback et collaborateurs sur la nature polymérique de l'inducteur, également suggérée par les observations qui avaient été faites grâce aux approches de

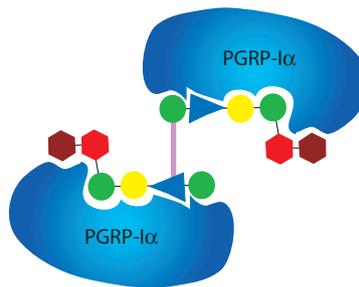
DAP-PGN monomérique



DAP-PGN polymérique



Lys-PGN polymérique



N-acetyl glucosamine	Alanine	acide <i>meso</i> -diaminopimelique
acide N-acetyl muramique	acide glutamique	L-lysine
acide N-acetyl (1-6 anhydro)muramique		pont inter-peptides

Figure 11. Schéma des différents modèles moléculaires de reconnaissance du PGN par les PGRPs. Ce schéma synthétise les modèles de reconnaissance du PGN par les PGRPs, basés sur les résultats obtenus grâce aux différentes approches présentées dans le texte.

crystallisation. Il a ainsi été démontré que le motif minimal nécessaire à l'activation de la voie Toll, est un dimère (M-tetra_{Lys} □ M-tetra_{Lys}) (Filipe et al., 2005).

Pour synthétiser l'ensemble des informations, on peut proposer un modèle général de l'interaction PGRP/PGN dans lequel le Lys-PGN est reconnu sous la forme d'un polymère (au minimum un dimère (M-tetra_{Lys} □ M-tetra_{Lys}). Le DAP-PGN quant à lui peut être reconnu sous une forme monomérique TCT (GM(anh)-tetra_{DAP}) ou polymérique (GM-tetra_{DAP} □ GM-tetra_{DAP}). Il semble que dans tous les cas, l'intervention de deux PGRPs soit nécessaire (Figure 11).

On peut se poser la question de «l'intérêt» pour le système immunitaire de la drosophile, de disposer d'un mécanisme de reconnaissance différentiel des DAP-PGN monomériques et polymériques. Le TCT est, comme on l'a vu, un facteur de virulence chez certaines bactéries à Gram-négatif. Il est probable que la drosophile se soit adaptée aux infection par ce type de bactéries en développant un mécanisme de détection spécifique à cette forme de PGN.

D'autre part, le Lys-PGN présente selon le type de bactérie à Gram-positif, une certaine variabilité structurale, notamment au niveau de la composition du pont inter-peptidique. On peut alors se demander si PGRP-SA est capable de détecter l'ensemble de ces différents Lys-PGN. Des résultats obtenus au cours de l'étude du rôle de PGRP-SD permettent, comme nous allons le voir, de répondre à cette question.

Il apparaît également que la détection du PGN nécessite la présence d'une structure minimale comportant au moins deux sucres (GlcNac-MurNac) reliés au peptide souche. Je vais présenter des données indiquant que la dégradation enzymatique de ce motif minimal permet à la drosophile de réguler l'induction de ses voies immunitaires.

Partie 1:
PGRP-SD, un PRR des bactéries à
Gram-positif

Partie 1 □ PGRP-SD, un PRR des bactéries à Gram-positif

L'identification du premier PRR de drosophile a été rendue possible par la réalisation, dans notre équipe, d'un crible génétique utilisant les bactéries à Gram-positif *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) et *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Michel et al., 2001). La protéine PGRP-SA, sécrétée dans l'hémolymphe, a ainsi été caractérisée pour son rôle dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif, et l'activation en aval, de la voie Toll. Un travail d'une autre équipe du laboratoire a permis d'identifier une deuxième protéine sécrétée, GGBP-1, également impliquée dans le processus de reconnaissance des bactéries à Gram-positif et probablement dans la formation d'un complexe de reconnaissance avec PGRP-SA (Gobert et al., 2003).

Au cours d'expérimentations réalisées par la suite, nous nous sommes aperçus que certaines bactéries à Gram-positif sont capables d'activer la voie Toll lors d'une infection, en l'absence de PGRP-SA, de GGBP-1, ou des deux conjointement. Ces résultats indiquent clairement l'existence d'un troisième récepteur impliqué dans la reconnaissance de ces bactéries à Gram-positif. La protéine PGRP-SD étant potentiellement sécrétée et son domaine de liaison au PGN ne présentant pas les acides aminés conservés nécessaires à une activité catalytique, elle représentait un candidat très intéressant à cette fonction de PRR de bactéries à Gram-positif.

L'établissement de lignées mutantes présentant une délétion totale du gène *PGRP-SD*, obtenues grâce l'excision d'un élément transposable situé à proximité de ce locus, et la caractérisation phénotypique de ces mutants sont décrits dans la publication ci-dessous.

I. Résultats

A. Article

Dans ce travail, nous démontrons que PGRP-SD est un récepteur capable de reconnaître certaines bactéries à Gram-positif. Nous avons établi que PGRP-SD coopère avec PGRP-SA et GNBP-1 dans la reconnaissance de ces bactéries et dans la signalisation en aval, menant à l'activation de la voie Toll et la régulation transcriptionnelle de gènes comme la *drosomycine*. Nos résultats attestent également que PGRP-SD reconnaît le Lys-PGN de ces bactéries à Gram-positif. Par contre, aucun rôle dans la reconnaissance des bactéries à Gram-négatif et donc du DAP-PGN, ou des champignons n'a été mis en évidence pour PGRP-SD. Nous exposons enfin un résultat inattendu indiquant que ni la voie Toll, ni la voie IMD, ne sont requises pour la résistance à une infection par la bactérie à Gram-positif *S. aureus*.

B. Résultats complémentaires

1. Recherche d'une interaction biochimique entre PGRP-SD et PGRP-SA ou GNBP-1

Dans le travail décrivant le rôle de GNBP-1 dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif, les auteurs proposent que PGRP-SA et GNBP-1 fassent partie d'un même complexe de reconnaissance du PGN en amont de la voie Toll. Ils se basent notamment sur une expérience d'électrophorèse en conditions non dénaturantes, ayant permis de visualiser un complexe protéique reconnu à la fois par un anticorps dirigé contre PGRP-SA et par un anticorps contre GNBP-1. De plus, la surexpression conjointe de PGRP-SA et GNBP-1 permet l'activation constitutive de la voie Toll (Gobert et al., 2003).

Nous avons donc naturellement cherché à savoir si PGRP-SD fait également partie de ce complexe de reconnaissance. PGRP-SA et GNBP-1 interagissent génétiquement et biochimiquement. La surexpression de PGRP-SD avec PGRP-SA ou GNBP-1 ne permet pas l'activation de la voie Toll (cf. Article PGRP-SD, Figure S3). J'ai alors cherché à savoir, par une approche de co-immunoprécipitation, s'il existe une interaction biochimique entre PGRP-SD et PGRP-SA ou GNBP-1. Pour cela, j'ai tout d'abord généré différentes lignées de cellules S2 permettant la surexpression des protéines recombinantes PGRP-SD (marquées par un tag HIS-V5) et PGRP-SA. L'analyse par immunomarquage (Western blot) d'extraits de surnageants de ces cultures cellulaires indique que PGRP-SD est très majoritairement sécrétée, comme cela était prévu par la présence au sein de sa séquence aminée d'un peptide signal.

Après avoir mis en présence les surnageants cellulaires contenant les deux protéines, il n'a pas été possible de les co-immunoprécipiter (Figure 12). J'ai également tenté cette expérience en présence de bactéries *S. aureus* (10^6 /mL), afin de déterminer si la présence du PGN de cette bactérie pourrait favoriser l'interaction entre PGRP-SD et PGRP-SA. Dans ces conditions non plus, aucune co-immunoprécipitation n'a pu être observée.

D'autre part, des extraits protéiques de GNBP-1 (produits en baculovirus par l'équipe de Dominique Ferrandon) ont été mis à ma disposition pour tester l'éventualité d'une interaction entre cette protéine et PGRP-SD. Dans ce cas précis, la difficulté à obtenir une quantité acceptable de protéines GNBP-1 (due soit à un problème d'affinité de l'anticorps dans mes conditions expérimentales, soit à une dégradation de la protéine GNBP-1 dans les

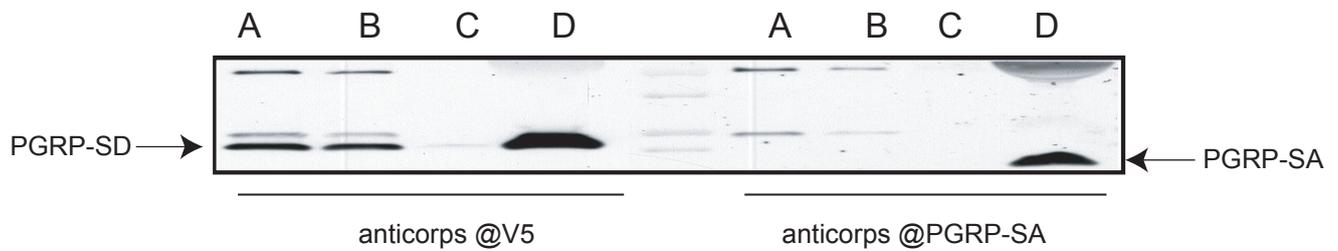


Figure 12. PGRP-SA et PGRP-SD ne co-immunoprécipitent pas.

Les surnageants des lignées cellulaires surexprimant PGRP-SA et PGRP-SD(HIS-V5) sont mis en présence pendant 2 heures à 25°C (piste D). La protéine PGRP-SD est ensuite précipitée grâce à l'anticorps @V5, en absence (piste A) ou en présence (piste B), de bactéries *S. aureus*. La piste C est un contrôle dans lequel l'anticorps @V5 permettant la précipitation, n'est pas ajouté. Après électrophorèse sur gel dénaturant et transfert, la membrane est révélée grâce à l'anticorps @V5 (pour PGRP-SD), et à l'anticorps @PGRP-SA.

échantillons utilisés), ne m'a pas permis d'effectuer cette expérience dans des conditions acceptables (résultats non présentés).

Même si ces expériences ne permettent pas de l'affirmer avec certitude, il semble que PGRP-SD ne contribue pas directement au complexe protéique formé par PGRP-SA et GNBP-1. Il est cependant probable que la présence de PGN induise la formation d'un complexe de reconnaissance et de signalisation dans lequel on retrouverait PGRP-SD.

2. Structure tridimensionnelle de PGRP-SD

Il serait maintenant nécessaire, pour mieux comprendre la spécificité de l'interaction entre le PGN et PGRP-SD, de connaître sa structure tridimensionnelle. Nous avons donc établi une collaboration avec Alain Roussel, à qui nous avons fourni la lignée cellulaire permettant la surexpression de PGRP-SD (His-V5). L'obtention d'une quantité suffisante de protéine, ainsi que sa cristallisation ont été possibles. La résolution ainsi que l'analyse de la structure tridimensionnelle sont en cours. Ces résultats, lorsqu'ils seront comparés à ceux publiés sur PGRP-SA, devraient fournir des indications intéressantes sur la spécificité potentielle de chacun de ces PRRs pour les différents Lys-PGN. D'autre part, il est également prévu de tenter de co-cristalliser PGRP-SD avec différents types de Lys-PGN.

II. Discussion

Les résultats obtenus durant ce travail révèlent que la reconnaissance d'une grande variété de bactéries à Gram-positif nécessite la présence d'au moins trois PRRs. Nous avons ainsi démontré que PGRP-SD coopère avec PGRP-SA et GNBP-1 dans cette reconnaissance permettant ensuite l'activation de la voie Toll.

Comme nous l'avons décrit, l'activation de cette voie suite à une infection par les bactéries *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*), *E. faecalis*, *S. pyogenes* et *S. aureus*, n'est pas bloquée dans un contexte génétique double mutant pour PGRP-SA et GNBP-1 alors qu'elle l'est pour les double mutants PGRP-SD/PGRP-SA et PGRP-SD/GNBP-1. Cela indique que PGRP-SD joue un rôle différent et complémentaire aux deux autres récepteurs dans la reconnaissance des bactéries Gram-positif. Si seule la liaison de

PGRP-SA avec le PGN de certaines bactéries a été démontrée (Chang et al., 2004), on peut considérer comme très probable, sur la base notamment des différentes études structurales réalisées, que le domaine PGRP de PGRP-SD permette également la liaison au PGN. La résolution de la structure cristalline de PGRP-SD devrait nous en apporter la confirmation.

Je propose que dans la reconnaissance du Lys-PGN, PGRP-SA et PGRP-SD assure la détection d'un large spectre de bactéries à Gram-positif, avec une affinité différente pour chacun des types de PGN. PGRP-SA et PGRP-SD constituent ainsi un répertoire de reconnaissance efficace des bactéries à Gram-positif.

L'observation des séquences en acides aminés de PGRP-SA et PGRP-SD permet d'appuyer cette hypothèse. En effet, si les acides aminés constituant le fond du sillon de reconnaissance du PGN sont très conservés, ceux formant les bords du sillon (notamment la première hélice α_1), présentent une grande divergence. Cela pourrait permettre de comprendre la différence d'affinité probable entre PGRP-SA et PGRP-SD pour un même Lys-PGN (Figure 10) (Reiser et al., 2004). Il a par ailleurs été montré que le simple fait de substituer la Serine75 de PGRP-SA en alanine suffit à augmenter son affinité pour le PGN de *M. luteus*. De même, la substitution de la Valine44 en alanine (qui correspond à l'acide aminé trouvé chez PGRP-SD) baisse de moitié l'affinité de PGRP-SA pour ce PGN (Chang et al., 2004). Enfin, l'absence chez PGRP-SD d'un des ponts disulfures présents chez PGRP-SA indique que son domaine PGRP doit avoir une conformation plus ouverte, ce qui représente également un élément d'explication pour d'éventuelles différences d'affinité.

D'autre part, il est particulièrement intéressant de remarquer qu'un acide aminé présent chez tous les PGRPs impliqués dans la reconnaissance du DAP-PGN, une arginine, est présente chez PGRP-SD alors qu'elle ne l'est pas chez PGRP-SA (Figure 10) (Lim et al., 2006). La présence de cette arginine ne semble pas conférer à PGRP-SD la capacité à reconnaître le DAP-PGN, mais elle pourrait par contre lui permettre de détecter des variations dans la composition de certains Lys-PGN que ne reconnaît pas PGRP-SA. Dans ce sens, une différence notable existant entre le Lys-PGN des différentes bactéries à Gram-positif est la composition en acides aminés du pont inter-peptidique reliant les peptides souches (Schleifer and Kandelr, 1972).

En partant de l'hypothèse (cf. Introduction.V) que la reconnaissance du Lys-PGN se fait à partir de dimères ou trimères de (GM-tetra_{Lys} \square GM-tetra_{Lys}), on peut alors proposer un modèle dans lequel, selon le PGN en présence, un homodimère de PGRP-SA ou un hétérodimère de PGRP-SA et PGRP-SD se forme, permettant ensuite la transmission d'un

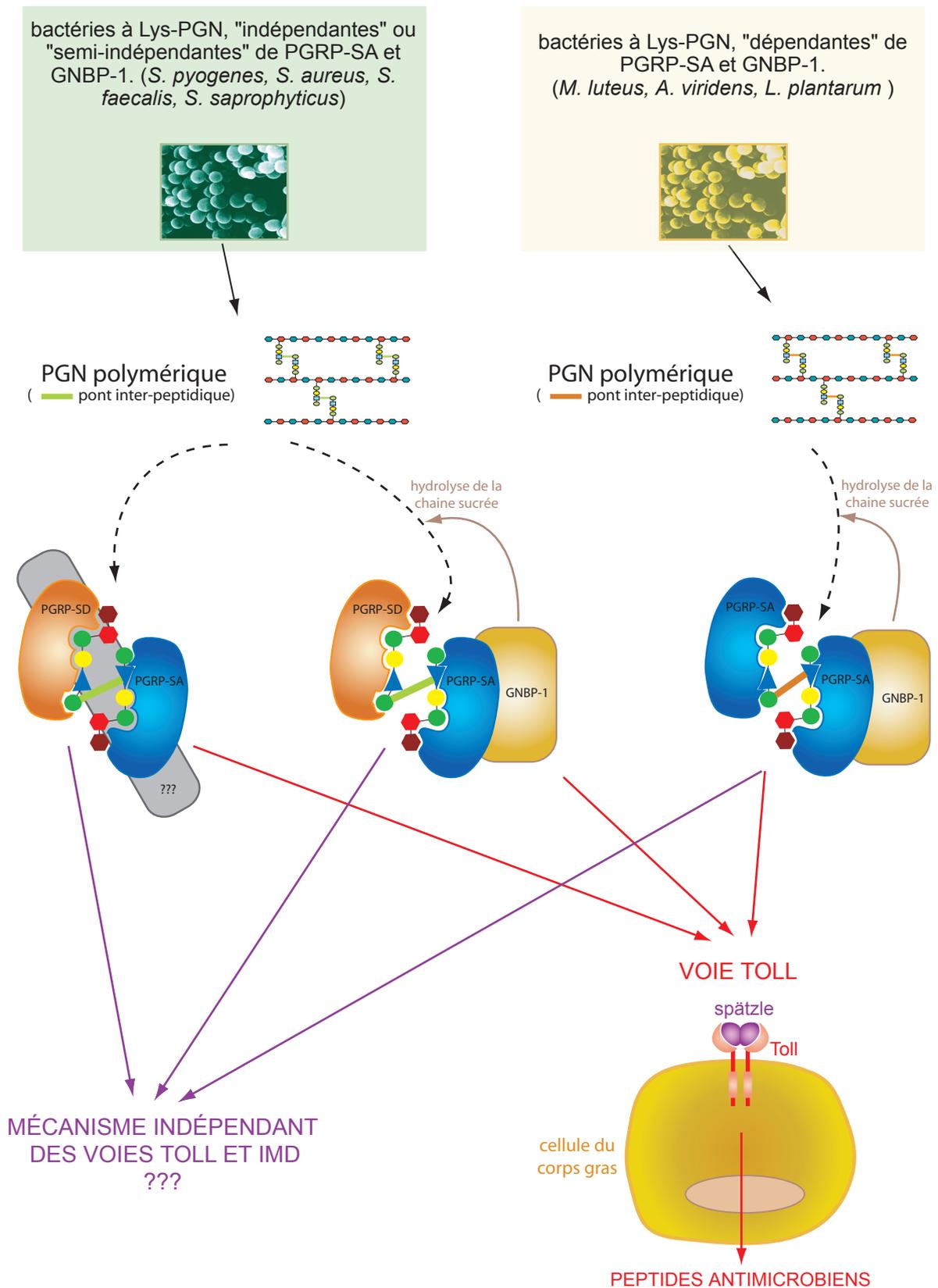


Figure 13. Rôle de PGRP-SD dans la reconnaissance des bactéries à Lys-PGN.

Le modèle présenté ici propose que le Lys-PGN de certaines bactéries à Gram-positif comme *M. luteus*, *A. viridens* ou *L. plantarum* est reconnu par un dimère de PGRP-SA. Pour d'autres bactéries à Gram-positif comme *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. faecalis* ou *S. saprophyticus*, la reconnaissance de leur Lys-PGN nécessite la présence de PGRP-SD et PGRP-SA. La fonction de GNBP-1 pourrait être, entre autres, l'hydrolyse de la chaîne sucrée du PGN, permettant ensuite la reconnaissance des dimères par PGRP-SA et PGRP-SD. L'existence d'un quatrième acteur dans la reconnaissance et la transmission du signal est suggérée par nos résultats, de même que l'intervention d'un mécanisme autre que les voies Toll et IMD, dans la résistance à certaines infections. La nature variable du pont inter-peptidique reliant les peptides souches du PGN, est schématisé par deux couleurs différentes.

signal (Figure 13). Même si cela reste totalement hypothétique, on peut également imaginer que pour certaines bactéries (parmi celles que nous n'avons pas testées expérimentalement), la reconnaissance du PGN dépende uniquement de PGRP-SD.

Le mécanisme de la transmission du signal, après la reconnaissance du PGN, reste pour l'instant beaucoup moins claire. On pense que PGRP-SA et GNBP-1 forment un complexe de reconnaissance, permettant également la transmission du signal vers la cascade protéolytique aboutissant à la coupure de Spätzle, et ainsi à l'activation du récepteur Toll (Gobert et al., 2003). Il a d'autre part été proposé que la partie N-terminale de tous les PGRPs pourrait être impliquée dans une interaction protéine-protéine (Kim et al., 2003), mais notre approche expérimentale n'a pas permis de valider une telle possibilité pour PGRP-SD vis à vis de PGRP-SA ou GNBP-1. Il est cependant probable que PGRP-SD, par l'intermédiaire de sa reconnaissance du PGN, interagisse directement ou indirectement avec PGRP-SA, ou GNBP-1, ou les deux à la fois, et participe ainsi à la transmission du signal vers la voie Toll.

Il est vraisemblable que GNBP-1 joue plutôt un rôle dans la transmission du signal, étant donné que son domaine de reconnaissance du beta(1-3)glucane ne peut probablement pas reconnaître le PGN (Kim et al., 2000). Une étude récente apporte un éclairage différent sur la participation de GNBP-1 au processus de reconnaissance du PGN (Filipe et al., 2005). Les auteurs de ce travail présentent des données indiquant que la protéine GNBP-1 ne serait pas directement requise dans la reconnaissance du motif dimère de PGN (GM-tetra_{Lys} □ GM-tetra_{Lys}). Ils proposent que, malgré un domaine glucanase auquel il manque certains acides aminés importants pour l'activité enzymatique, GNBP-1 soit nécessaire à l'hydrolyse de la chaîne sucrée du PGN. Cette coupure enzymatique permettrait de libérer des polymères de PGN avec des extrémités chimiquement non réduites, ce qui semble être nécessaire à la bonne reconnaissance par PGRP-SA (et par extrapolation, par PGRP-SD), et donc à l'activation de la voie Toll.

Il faut souligner que nous n'avons à l'heure actuelle aucune indication sur le ou les intermédiaires moléculaires qui transmettent l'information de la reconnaissance du PGN, à la cascade de protéases permettant le clivage de Spätzle et l'activation de la voie Toll. Cependant, dans le cas où GNBP-1 transmettrait effectivement ce signal, il est probable qu'une autre protéine puisse également jouer un rôle similaire. En effet, les mutants GNBP-1^{osi}, et PGRP-SA^{semi□}GNBP-1^{osi} présentent toujours une activation normale de la voie Toll après une infection par des bactéries à Gram-positif comme *S. pyogenes* ou *S. saprophyticus* (Article PGRP-SD, Figure 1).

Un dernier résultat à la fois intéressant et surprenant de ce travail, est la mise en évidence du rôle mineur joué par les voies Toll et IMD dans la capacité des drosophiles à résister à une infection à *S. aureus*. Il apparaît par contre, que la présence des trois protéines PGRP-SA, PGRP-SD, et GGBP-1 soit requise pour permettre une résistance optimale à cette infection, la lignée mutante pour ces trois gènes présentant la susceptibilité la plus forte (Article PGRP-SD, Figure 4). Il est également notable que dans le cas d'une infection à *S. pyogenes*, les lignées mutantes pour PGRP-SA, PGRP-SD ou GGBP-1 présentent une susceptibilité assez forte, alors que l'activation de la voie Toll est parfaitement normale. Toutes ces observations indiquent clairement que des mécanismes autres que la synthèse des peptides antimicrobiens par les voies Toll et IMD, sont nécessaires et suffisants à assurer la résistance à certaines infections par des bactéries à Gram-positif comme celles à *S. aureus* et *S. pyogenes*. Nous n'avons pour l'heure pas d'indication précise sur la nature des mécanismes en jeu, mais on peut évoquer le processus de phagocytose, la production de radicaux libres, d'oxyde nitrique, ou bien l'activation d'une autre voie moléculaire de l'immunité.

Partie 2:
PGRP-SC1 et PGRP-SC2 régulent
l'induction de la voie IMD

Partie 2 □ PGRP-SC1 et PGRP-SC2 régulent l'induction de la voie IMD

Nous avons une bonne compréhension du rôle joué par les PGRPs non catalytiques. Leur capacité à reconnaître le PGN leur permet d'agir comme des PRRs de ce composant moléculaire de la paroi bactérienne, et d'induire en réponse l'activation des voies de signalisation de la réponse immunitaire.

La fonction des PGRPs catalytiques reste par contre beaucoup plus floue. Les comparaisons des séquences des PGRPs avec celle du lysozyme du bactériophage T7, et la résolution de la structure tridimensionnelle de PGRP-LB, permettent de prédire une activité de NAMLAA pour 5 PGRPs de drosophile (cf. Introduction.IV). Une étude biochimique a permis de démontrer que PGRP-SC1b fonctionne *in vitro* comme une NAMLAA, à la fois envers le Lys-PGN de *S. aureus* ou *M. luteus*, et le DAP-PGN de *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*), en coupant la liaison lactylamide entre le MurNac et la première alanine du peptide souche (Mellroth et al., 2003). Une observation importante de ce travail est qu'une fois coupée par PGRP-SC1, le PGN semble avoir perdu une grande part de son pouvoir d'induction des peptides antimicrobiens. Ainsi, les auteurs proposent que la fonction *in vivo* des PGRPs catalytiques soit de jouer le rôle de « nettoyeur » du PGN (rôle de scavenger) et éventuellement, pour certains d'entre eux, de moduler la réponse immunitaire.

Il nous est donc apparu important de pouvoir clairement déterminer le rôle *in vivo* de ce type de PGRPs catalytiques. Dans ce but, nous avons choisi de nous intéresser à PGRP-SC1b. L'analyse du locus génomique de *PGRP-SC1b* montre que ce gène fait partie d'un cluster de 3 *PGRPs* □ *PGRP-SC1a*, *PGRP-SC1b* et *PGRP-SC2*. La description précise de ces gènes, de leur transcrits et des protéines pour lesquelles ils codent est présentée dans l'article qui suit. Ces 3 gènes codent pour deux protéines, PGRP-SC1 et PGRP-SC2 qui ont en commun 70% de leur séquence en acides aminés. Cette très forte homologie de séquence, ainsi que le fait que leur tissu d'expression majoritaire soit identique (le tube digestif), indique probablement l'existence d'une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines. Notre approche expérimentale étant majoritairement basée sur l'analyse de mutants « perte de

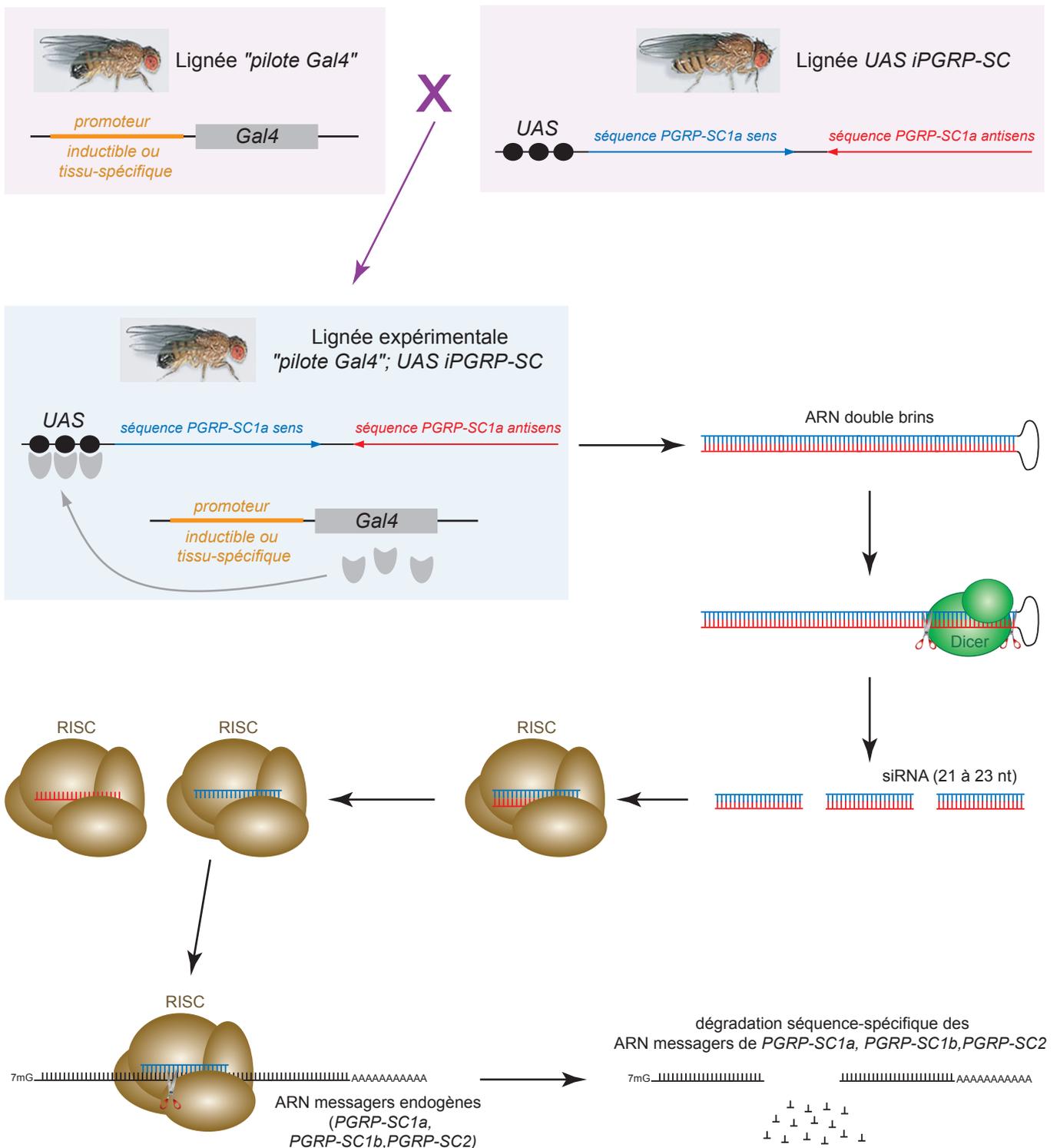


Figure 14. Mécanisme de l'interférence à l'ARN *in vivo* mis en oeuvre pour diminuer le taux des ARNs messagers de PGRP-SC1a, PGRP-SC1b et PGRP-SC2.

Les drosophiles porteuses à la fois du transgène *UAS iPGRP-SC* (séquence à cibler clonée en sens-antisens) et du transgène *pilote-Gal4*, transcrivent des ARNs double brin sous le contrôle du pilote, grâce au système d'expression UAS-Gal4 de levure. Les ARNs double brin produits sont reconnus et découpés en brins de 21 à 23 nucléotides par les protéines endogènes Dicer. Ces petits ARNs double brin appelés siRNA (small interfering RNA) sont pris en charge par le complexe protéique endogène RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui va les présenter sous forme simple brin aux ARNs messagers. La complémentarité de séquence avec celle de l'ARN messager va permettre son ciblage et induire sa dégradation enzymatique par les nucléases du complexe RISC.

fonction», il nous a semblé nécessaire, afin de contourner cette probable redondance, d'obtenir une lignée permettant l'extinction simultanée de l'expression des 3 gènes.

Nous avons dans un premier temps utilisé la même approche que pour l'obtention des mutants *PGRP-SD*, car nous disposions d'une lignée portant un élément transposable inséré au sein du locus *PGRP-SC*. Cette stratégie n'a malheureusement pas permis d'obtenir des mutants présentant une délétion totale ou même partielle de ces gènes. Nous avons alors décidé de nous servir du mécanisme endogène d'interférence à l'ARN, qui permet de dégrader spécifiquement un ARN messager en réponse à la présence d'un ARN double brin de même séquence nucléotidique (Meister and Tuschl, 2004). Cette stratégie a nécessité l'établissement de lignées de drosophiles (*UAS iPGRP-SC*), porteuses d'un transgène permettant l'expression d'un ARN double brin sous le contrôle du promoteur de levure *UAS*. Les lignées ainsi obtenues, une fois croisées avec des lignées porteuses d'un transgène pilote - *Gal4*, permettent l'expression de cet ARN double brin. Une fois activé, le mécanisme d'interférence à l'ARN induit théoriquement la diminution du nombre de copies des ARNs messagers de *PGRP-SC1a*, *PGRP-SC1b* et *PGRP-SC2*, grâce au ciblage et à la dégradation séquence-spécifique de leurs transcrits (Figure 14).

Ces lignées de drosophiles constituent ainsi un outil essentiel à l'étude du rôle *in vivo* de *PGRP-SC1* et *PGRP-SC2*.

I. Résultats

A. Article

Nous démontrons que dans un contexte infectieux, la forte diminution des taux d'ARNs messagers de *PGRP-SC1a*, *PGRP-SC1b* et *PGRP-SC2* induit une augmentation dans la durée et dans l'intensité, de l'activation de la voie IMD (mesurée grâce aux transcrits de *diptéricine*). Nos résultats indiquent également qu'une trop forte activation de la voie IMD au stade larvaire provoque une augmentation de l'apoptose au niveau de certains tissus mitotiques comme les disques imaginaux d'ailes. Cette dérégulation provoque l'apparition de défauts développementaux, et peut être létale pour la larve.

Nous proposons que le rôle de *PGRP-SC1* et de *PGRP-SC2* est, comme cela a été démontré *in vitro*, de couper la liaison lactylamide entre le MurNac et la première alanine du

peptide souche. Il a été démontré que le motif minimal de PGN reconnu par les PGRPs doit contenir cette liaison (cf. Introduction.V). L'activité catalytique des PGRP-SC1/2 aurait donc pour effet de limiter rapidement le nombre de molécules de PGN capables d'activer la voie IMD.

Nous avons observé que la forte diminution des transcrits *PGRP-SC1/2* que nous induisons, n'a pas d'effets sur le niveau d'activation de la voie Toll suite à une infection. Ceci peut s'expliquer de deux façons différentes□

- soit la spécificité de reconnaissance de PGRP-SC1 et PGRP-SC2 est restreinte au DAP-PGN,

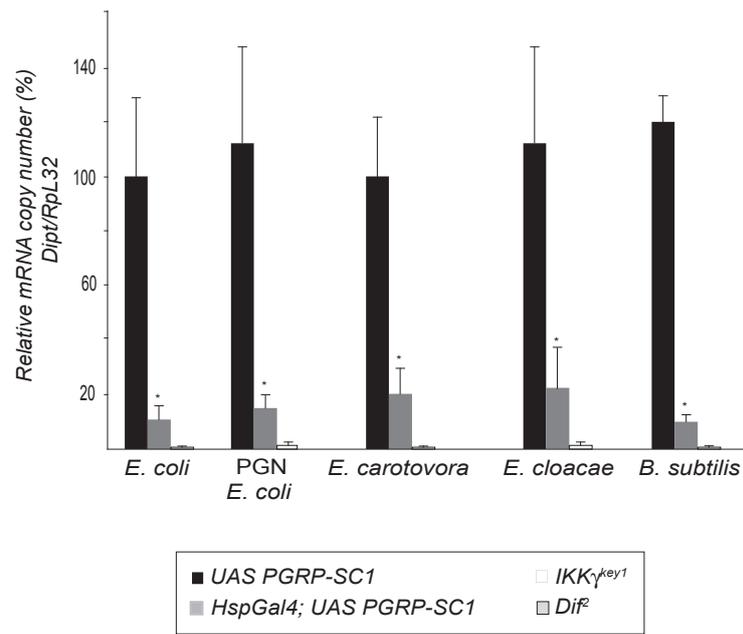
- soit les modalités d'activation différentes des voies Toll et IMD sont responsables de cette différence de sensibilité à la diminution du taux de PGRP-SC.

En effet, comme je l'ai décrit plus haut, la voie Toll est activée par le biais d'une cascade protéolytique, permettant de transmettre et d'amplifier un signal initial (la reconnaissance de Lys-PGN par PGRP-SA, PGRP-SD et GGBP-1). Il est donc peu probable qu'une fois activée, la voie Toll puisse être graduellement réprimée proportionnellement à la baisse du taux d'inducteur. La voie IMD par contre, est directement activée par la fixation du ligand DAP-PGN sur le récepteur PGRP-LC. On peut donc supposer qu'il y a une corrélation directe entre la quantité de molécules inductrices et le niveau d'activation de la voie.

Des données favorisant la deuxième hypothèse seront présentées plus loin (cf. Partie 2. I.B.1)

Nous confirmons enfin que *PGRP-SC1* et *PGRP-SC2* sont très majoritairement transcrits par les cellules du tube digestif. Nous montrons d'autre part que la réduction du taux de ces deux protéines, spécifiquement dans ce tissu, suffit pour augmenter le niveau d'induction de la voie IMD au niveau du corps gras larvaire suite à l'infection. Ce résultat souligne l'importance, sur laquelle je reviendrai dans la discussion, du rôle joué par les PGRP-SC1/2 au niveau du tube digestif.

A.



B.

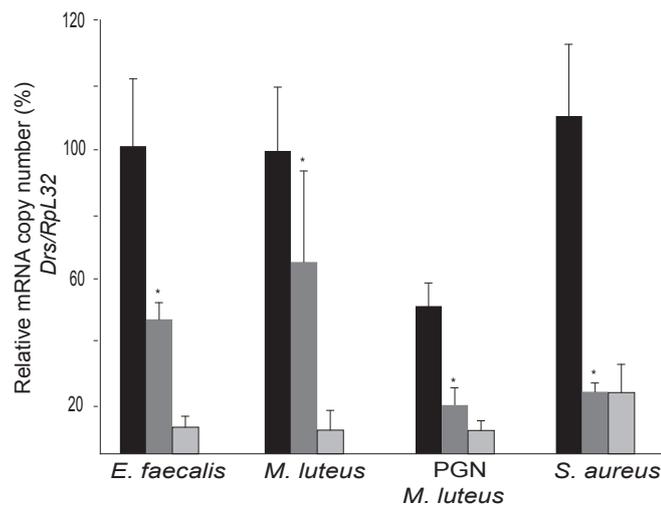


Figure 15. La surexpression de PGRP-SC1 bloque l'activation des voies IMD et Toll.

A. La surexpression de PGRP-SC1 bloque l'activation de la voie IMD, après une infection par des bactéries à Gram-négatif ou une injection du DAP-PGN de *E. coli*, comme l'indique la quantification des transcrits de la *diptericine*, 6 heures après l'induction.

B. La quantification des transcrits de la *drosomycine*, 24 heures après une infection par des bactéries à Gram-positif ou une injection du Lys-PGN de *S. aureus*, montre que la surexpression de PGRP-SC1 bloque également la voie Toll. On peut s'apercevoir que le blocage est le plus fort suite à l'infection à *S. aureus*.

(choc thermique: 45min à 37°C)

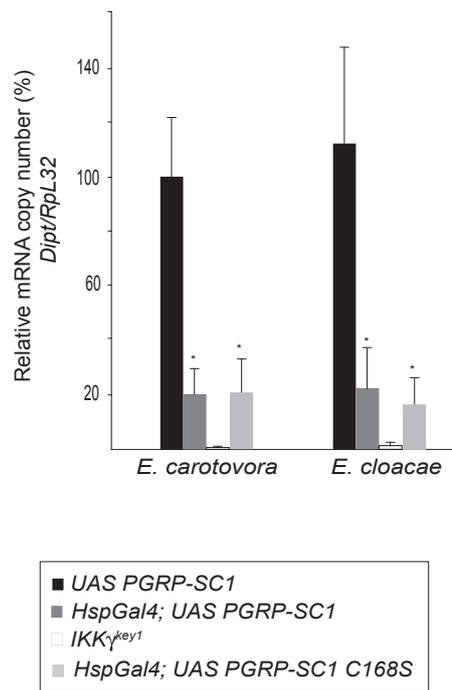


Figure 16. Une version catalytiquement inactive de PGRP-SC1 bloque l'activation de la voie IMD. La surexpression d'une version mutée au niveau du site catalytique de PGRP-SC1 (PGRP-SC1 C168S) bloque, comme celle de PGRP-SC1 natif, l'activation de la voie IMD suite à une infection par des bactéries à Gram-négatif.

B. Résultats complémentaires

Les résultats complémentaires présentés ici n'ont pas été intégrés à l'article publié, car bien qu'ils donnent des indications intéressantes sur la spécificité d'action des PGRP-SC, ils nous obligent également à nous appuyer sur une hypothèse que nous ne sommes pas capable de valider *in vivo*.

1. La surexpression de PGRP-SC1 bloque l'induction des voies IMD et Toll suite à une infection

Afin de déterminer si la différence d'activité des PGRP-SC vis-à-vis de la régulation des voies Toll et IMD est liée au mode d'activation des voies elles-mêmes ou à une spécificité vis-à-vis du DAP-PGN, nous avons suivi les effets de la surexpression de PGRP-SC1 sur l'inductibilité de ces deux voies. Comme on peut le voir grâce à la quantification des transcrits de la *diptéricine* et de la *drosomycine*, la surexpression de PGRP-SC1 bloque aussi bien la voie IMD que la voie Toll, suite à une infection par des bactéries à Gram-négatif ou à Gram-positif, respectivement (Figure 15). Le même blocage est observé quand on induit les voies immunitaires directement avec du DAP-PGN ou du Lys-PGN purifiés. Comme cela était déjà suggéré par Mellroth P. et collaborateurs, il semble que PGRP-SC1 soit capable d'agir contre tous les types de PGN, présentant donc un spectre assez large de reconnaissance et d'activité catalytique (Mellroth et al., 2003).

2. La surexpression d'une version de PGRP-SC1 mutée au niveau du site catalytique bloque également la voie IMD suite à une infection par des bactéries à Gram-négatif

Il a été démontré *in vitro* que le remplacement de la Cystéine en position 168 par une Sérine (C168S) permet de générer une version catalytiquement inactive de la protéine PGRP-SC1, incapable de dégrader le PGN mais toujours à même de le reconnaître et de se lier à lui (Mellroth et al., 2003). Nous avons donc construit une lignée de drosophiles transgéniques *UAS PGRP-SC1(C168S)* permettant l'expression de cette protéine mutée, et cherché à savoir si sa surexpression bloquerait encore la voie IMD suite à une infection. Contrairement à ce que nous attendions, cette version catalytiquement inactive est toujours capable de bloquer

l'induction de la voie IMD suite à une infection avec les bactéries à Gram-négatif *E. coli* et *Erwinia carotovora carotovora* (*E. carotovora*) (Figure 16).

Une hypothèse pouvant expliquer le blocage de la voie IMD que nous observons, est que les PGRP-SC1(C168S) synthétisées lors de cette surexpression se lient au PGN, empêchant ainsi sa reconnaissance par PGRP-LC et l'activation de la voie. L'activité enzymatique de PGRP-SC1 ayant été démontrée de façon indiscutable *in vitro*, il est vraisemblable que PGRP-SC1 et PGRP-SC2 disposent également de cette fonction catalytique *in vivo*. On ne peut cependant pas totalement exclure que leur rôle *in vivo* puissent également dépendre de cette capacité de titration du PGN en le séquestrant.

II. Discussion

Nos résultats démontrent que PGRP-SC1 et PGRP-SC2 ont un rôle fondamental dans le contrôle de l'intensité et du temps d'induction de la voie IMD, suite à une infection. En l'absence de la régulation qu'ils assurent, l'augmentation de l'induction de la voie IMD au stade larvaire est fortement dommageable, et des conséquences développementales ainsi qu'une forte létalité larvaire, sont observées.

Nous n'avons pas pu démontrer que le rôle enzymatique de PGRP-SC1 et PGRP-SC2 était fondamentalement requis *in vivo*, mais les données biochimiques *in vitro* militent fortement pour cette hypothèse. D'autre part, nous savons que PGRP-SC1 et PGRP-SC2 sont exprimées de façon constitutive dans le tube digestif et qu'une infection n'augmente que faiblement leur niveau d'expression, et ce essentiellement dans le corps gras (Werner et al., 2000). Or une action des PGRP-SC1/2 par leur fixation au PGN (sans le dégrader), l'empêchant ainsi de se lier à PGRP-LC est difficilement concevable si le nombre de molécules de PGRP-SC n'est pas fortement augmenté suite à l'infection. L'hypothèse d'une activité enzymatique NAMLAA pour les PGRP-SC1/2 est donc la plus probable pour expliquer les effets que nous avons observés *in vivo*. D'autre part, peu de temps après la parution de notre travail sur les PGRP-SC1/2, une étude sur le rôle *in vivo* d'une autre PGRP catalytique, PGRP-LB, a été publiée (Zaidman-Remy et al., 2006). Les auteurs de ce travail démontrent que PGRP-LB a comme prévu, une activité *in vivo* de NAMLAA et que son absence provoque également une augmentation dans l'intensité et la durée de l'induction de la

voie IMD. Les résultats présentés par Zaidman-Remy et collaborateurs sont très proches de ceux que nous avons obtenus, et renforce notre intime conviction que la fonction des PGRP-SC est liée à une activité NAMLAA.

Les données décrites indiquent que PGRP-LB est également produite par les cellules du tube digestif. Quelques différences intéressantes entre PGRP-LB et les PGRP-SC doivent néanmoins être soulignées. Ainsi, PGRP-LB présente une spécificité d'action vis-à-vis du DAP-PGN contrairement à PGRP-SC1 dont le spectre d'action est plus large (Mellroth et al., 2003). D'autre part, la transcription de *PGRP-LB*, à la différence de celle des *PGRP-SC1/2*, n'est pas constitutive, mais est induite sous le contrôle de la voie IMD, environ 12 heures après une infection. Les expériences réalisées par Zaidman-Remy et collaborateurs, ont été faites chez l'adulte, et nous ne savons donc pas si chez la larve, stade auquel nous avons démontré la nécessité de limiter l'activation de la voie IMD, PGRP-LB joue également un rôle. Son activité transcriptionnelle étant sous le contrôle de la voie IMD, qui peut être induite aussi bien au stade larvaire qu'au stade adulte, on peut cependant supposer que PGRP-LB a un rôle similaire chez la larve.

L'ensemble de nos données sur les PGRP-SC ainsi que celles obtenues sur PGRP-LB me permettent de proposer un modèle de régulation de la voie IMD suite à une infection, intégrant le rôle de ces 3 PGRPs catalytiques (Figure 17).

Les larves de drosophiles, comme les adultes, vivent et se nourrissent sur des végétaux, souvent en état de décomposition. Sur ce milieu nutritif se développe également une flore bactérienne importante, que l'animal ingère donc en même temps que sa nourriture. Il est important qu'une fois dans le tube digestif, ces bactéries n'activent pas la réponse immunitaire sans que cela soit réellement nécessaire. Il faut par contre qu'en cas d'infection, et donc de prolifération bactérienne trop importante, la présence de ces microorganismes puisse être contrée, en activant le système immunitaire. Comme nous l'avons vu, les bactéries renouvellent une grande partie de leur PGN à chacune de leur division. Je propose que le taux de PGN dans le tube digestif soit pour la drosophile un indicateur de la densité bactérienne et de son état de prolifération, et que les PGRP-SC servent de détecteur du taux de PGN en présence.

En conditions normales non infectieuses, les bactéries présentes dans le tube digestif de la drosophile libèrent une quantité modérée de PGN. Les PGRP-SC catalytiques permettent, en digérant ce PGN, de le rendre non immunogène et d'éviter ainsi que la voie

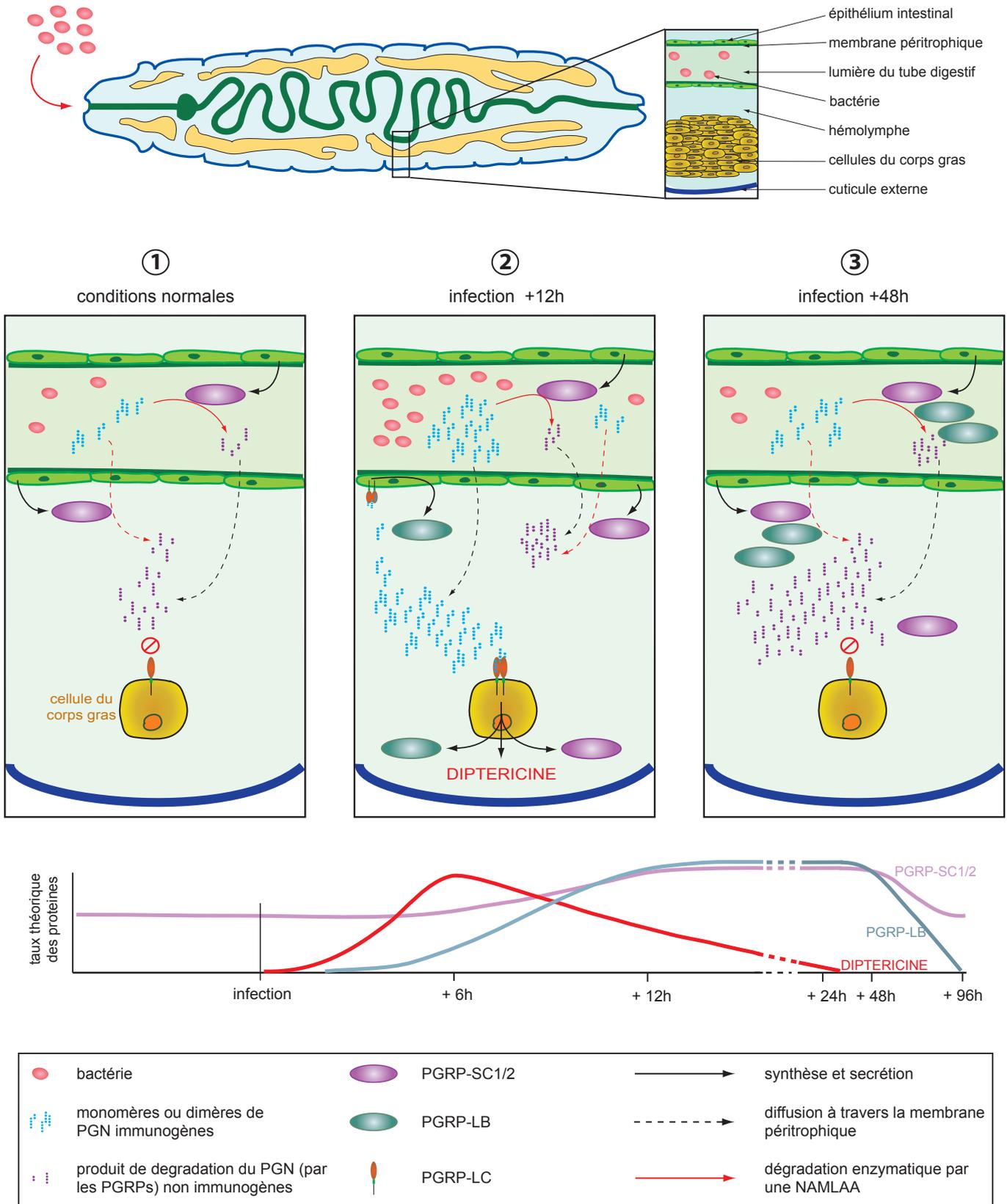


Figure 17. Rôles de PGRP-SC1, PGRP-SC2 (et PGRP-LB) dans la régulation de la voie IMD.

Ce modèle propose une organisation fonctionnelle de ces 3 PGRPs catalytiques dans le cas d'une infection naturelle bactérienne. Le schéma du haut représente la disposition du tube digestif et du corps gras d'une larve de troisième stade (tête à gauche). Le modèle en lui-même est présenté dans les 3 cadres du milieu. En dessous sont représentées les variations théoriques des taux protéiques des acteurs principaux de ce modèle. Pour l'explication du modèle, se référer au texte.

IMD soit activée inutilement (Figure 17,①). En cas de prolifération anormale d'une de ces bactéries, je propose que la quantité de PGN normalement libérée soit très rapidement augmentée, surpassant ainsi les capacités enzymatiques des PGRP-SC. De nombreuses molécules de PGN non digérées et donc immunostimulantes vont alors traverser l'épithélium digestif, et activer la voie IMD. L'activation de la voie IMD induit la traduction de peptides antimicrobiens comme la diptéricine, mais également celle de PGRP-LB, et dans une moindre mesure des PGRP-SC1/2 (Figure 17,②). Ceci permet d'une part de combattre les microorganismes infectieux, et d'autre part de rapidement diminuer le pouvoir immunostimulateur des molécules de PGN présentes dans le tube digestif et l'hémolymphe. Cette diminution du nombre de molécules de PGN activatrice va faire retomber le niveau d'activation de la voie IMD qui va donc s'éteindre au bout de quelques heures (Figure 17,③). Cette régulation permet en conséquence de faire retomber le taux des différentes protéines régulées par cette voie, comme PGRP-LB, les PGRP-SC, les peptides antimicrobiens, mais également les effecteurs responsables des phénotypes développementaux délétères observés en absence de régulation.

Selon ce modèle, on pourrait s'attendre à ce que même en l'absence d'infection naturelle, la diminution du taux de PGRP-SC dans le tube digestif induise la voie IMD, à cause des molécules de PGN relarguées par les bactéries présentes dans le tube digestif. Cependant, les conditions dans lesquelles les drosophiles de laboratoire vivent et se reproduisent (milieu de nutrition contenant antibactériens et antifongiques), ne permettent probablement pas le développement d'une flore intestinale bactérienne aussi importante que celle qui doit exister dans leur biotope naturel.

Il est par contre intéressant de souligner qu'une infection naturelle avec des bactéries *E. carotovora* déclenche l'induction de la voie IMD, même en présence d'un taux normal de PGRP-SC (ce qui n'est pas observé avec *E. coli*). Nous proposons l'hypothèse que *E. carotovora* relargue une quantité de PGN plus importante que les autres bactéries, dépassant alors probablement les capacités catalytiques des PGRP-SC, et menant à l'activation de la voie IMD.

Il faut noter qu'une infection naturelle réalisée avec le surnageant d'une culture de bactéries *E. carotovora*, active également la production de diptéricine par les cellules du corps gras. L'inducteur de cette réponse est très vraisemblablement le PGN relargué par les bactéries dans leur milieu de culture.

Comme je l'ai dit plus haut, une infection naturelle par des bactéries *E. coli* n'induit pas, dans un contexte génétique sauvage, l'activation de la voie IMD. Nous proposons que cette bactérie relâche une faible quantité de PGN, qui est dégradé par les PGRP-SC1/2 ce qui empêche l'activation de la voie IMD.

Il reste certaines questions importantes auxquelles nous ne pouvons pour l'instant apporter de réponses. Par exemple, nous ne savons pas si les PGRP-SC sont secrétées et agissent directement à l'intérieur du tube digestif, de l'autre côté dans l'hémolymphe, ou bien dans les deux compartiments à la fois.

D'autre part, il serait intéressant de déterminer comment le PGN libéré par les bactéries du tube digestif, passe dans l'hémolymphe et va activer la réponse immunitaire au niveau des cellules du corps gras. La membrane péritrophique qui tapisse la lumière intestinale, forme un filtre entre le contenu du tube digestif d'une part et l'épithélium digestif et la cavité interne de l'insecte d'autre part. Il a été estimé que seules des protéines de moins de 200 kDa peuvent traverser cette barrière qui présente des pores d'un diamètre maximum de 36 nm (Lehane, 1997). Ceci signifie que les monomères ou dimères de TCT peuvent facilement diffuser de façon passive vers l'hémolymphe, alors que les bactéries restent circonscrites à l'intérieur de la lumière digestive. D'autre part, des protéines comme les PGRPs ou les peptides antimicrobiens, ayant des tailles inférieures à 50 kDa, peuvent également diffuser à travers cette membrane péritrophique.

Notre approche expérimentale a permis de mettre en évidence le rôle des PGRPs catalytiques essentiellement au niveau du tube digestif. On peut cependant imaginer que le mécanisme de régulation de la voie IMD que nous décrivons, soit également utilisé au niveau d'autres épithéliums internalisés comme ceux des trachées ou du tractus génital. En effet, ces surfaces épithéliales se retrouvent également fréquemment en contact avec de nombreux microorganismes et demandent probablement le même type de régulation.

Les approches biochimiques effectuées par Mellroth P. et collaborateurs indiquent que l'affinité de PGRP-SC1 pour le PGN ne semble pas être spécifique du type Lys ou DAP de cette molécule. Leur publication montre également qu'une efficacité de coupure maximale est obtenue pour le Lys-PGN de *S. aureus*. Il semble cependant qu'une infection par *S. aureus* ne

provoque qu'une faible activation de la voie IMD, et que l'absence de PGRP-SC1 ne provoque pas d'augmentation significative de cette induction.

Un article publié en même temps que le nôtre propose que PGRP-SC1 joue un rôle totalement différent, que celui que nous présentons. Selon les auteurs de cette publication, PGRP-SC1 serait requis pour la phagocytose de *S. aureus*. L'absence de PGRP-SC serait fortement dommageable pour l'activation de la voie Toll (résultat en totale contradiction avec les nôtres) et pour la résistance des drosophiles à l'infection (Garver et al., 2006). La fonction catalytique aurait selon eux un rôle dans la phagocytose, mais ne serait pas requise pour l'activation de la voie Toll. Les résultats de ce travail s'appuient sur l'analyse d'un mutant (*picky*) dans lequel le niveau des transcrits de *PGRP-SC1a* et *PGRP-SC1b* est fortement diminué, sans affecter ceux de *PGRP-SC2*, contrairement à nos conditions expérimentales. Nous avons cherché à comprendre si cette différence génétique pourrait expliquer la différence d'activation de la voie Toll. Cependant, dans nos mains la souche mutante *picky* présente une activation normale de la voie Toll et une capacité de survie normale à l'infection par *S. aureus*. Enfin, il faut souligner que le protocole utilisé pour effectuer les tests de phagocytose est assez rudimentaire (Garver et al., 2006). Il existe d'autres protocoles plus fiables et présentant une réelle possibilité de validation statistique (Kocks et al., 2005). Il serait donc intéressant de pouvoir confirmer l'implication de PGRP-SC1 dans la phagocytose de *S. aureus*, avec cette autre méthode d'analyse.

Partie 3:
PGRP-LF, régulateur négatif de PGRP-
LC et de Wengen/Eiger

Partie 3 \square PGRP-LF, régulateur négatif de PGRP-LC et de Wengen/ Eiger

Les résultats que je vais présenter ont été obtenus grâce à des expérimentations réalisées par Cécile Vignal (qui a soutenu sa thèse en décembre 2005) et moi-même à Strasbourg, et par Frédéric Maillet à Marseille.

Une étude structure-fonction de PGRP-LC indique que la surexpression d'une version tronquée de ce récepteur ne comprenant que les domaines transmembranaire et extra-cytoplasmique, se comporte comme un dominant négatif vis-à-vis de la voie IMD (Vignal Cécile et Royet Julien, communication personnelle). En effet, des drosophiles surexprimant cette construction ne sont plus capables de résister à une infection par des bactéries à Gram-négatif, et leur induction de *diptéricine* est bloquée. Ces expériences indiquent également qu'une surexpression même très faible de PGRP-LC, suffit à induire fortement la voie IMD. Il paraît donc nécessaire, comme notre étude sur les PGRPs catalytiques l'a déjà montré, que l'activation de PGRP-LC soit finement régulée.

Ces observations ont attiré notre attention sur une autre PGRP, PGRP-LF, dont l'organisation structurelle est très similaire à la forme dominant négatif de PGRP-LC. En effet, PGRP-LF comporte une région intra-cytoplasmique extrêmement courte et deux domaines PGRP extracellulaires. Nous avons alors posé comme hypothèse de travail que la fonction de PGRP-LF pourrait être de réguler négativement l'activation de la voie IMD. En effet, PGRP-LF pourrait interagir avec le PGN, et ainsi empêcher sa reconnaissance par PGRP-LC. PGRP-LF pourrait également interagir directement avec PGRP-LC, empêchant une éventuelle dimérisation spontanée de ce récepteur, et l'activation subséquente de la voie IMD.

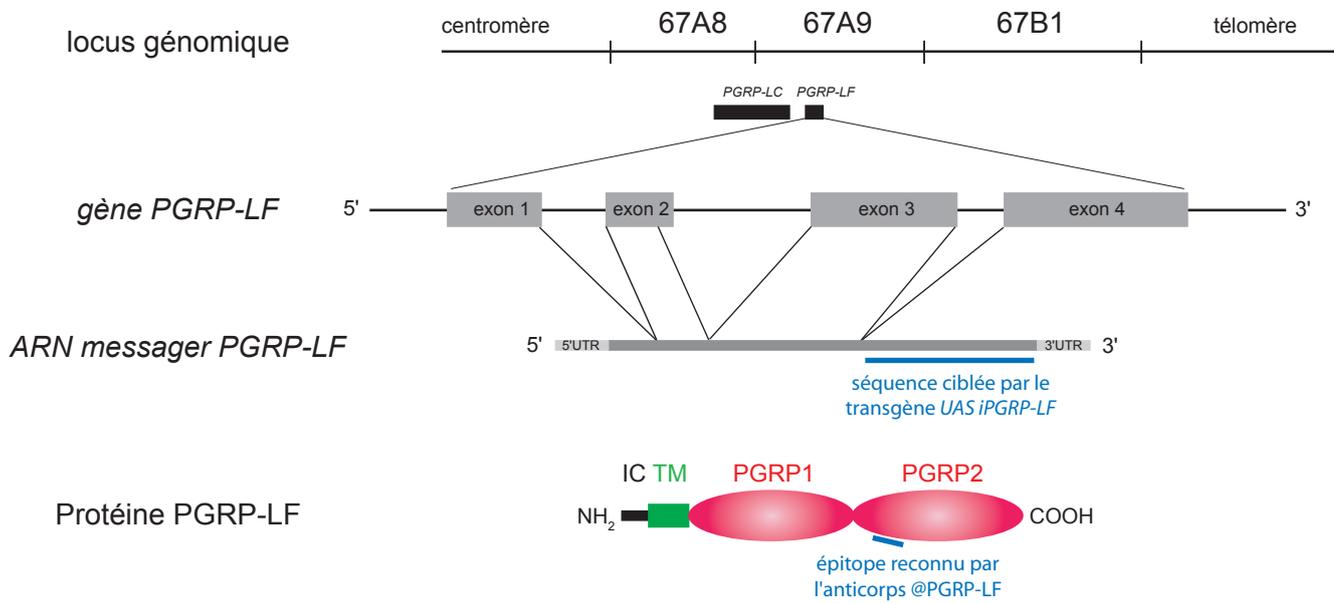


Figure 18. Structure du locus génomique de *PGRP-LF*.

Le gène *PGRP-LF* est situé à proximité de *PGRP-LC*. Son locus est constitué de 3 introns et 4 exons. Un seul transcrit a été identifié, codant pour une protéine composée d'un domaine intracytoplasmique très court (IC), d'un domaine transmembranaire (TM), et de deux domaines PGRP extracytoplasmiques: PGRP1 et PGRP2.

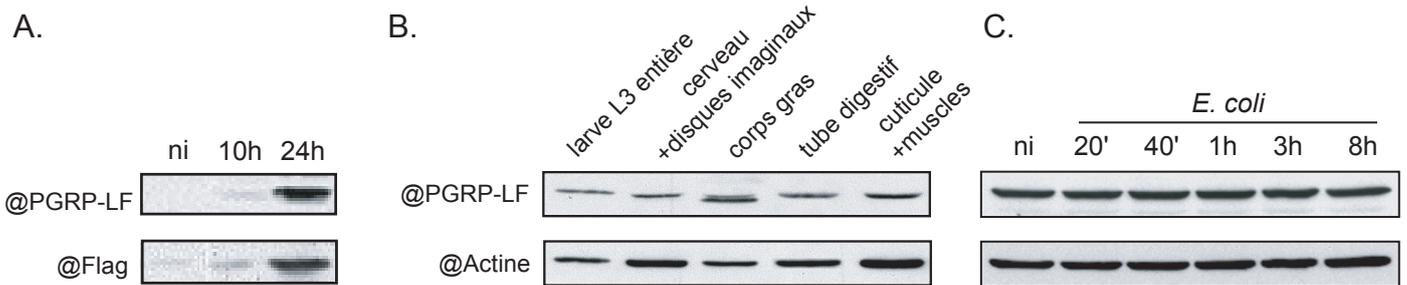


Figure 19. Domaine d'expression et inductibilité de la protéine PGRP-LF.

A. Test de la spécificité de l'anticorps anti-PGRP-LF sur des cellules S2 surexprimant la protéine PGRP marquée par un tag Flag sous le contrôle d'un promoteur sensible au cuivre. (ni: non induit; 10 et 24 heures après induction au CuSO_4).

B. Un immunomarquage de la protéine PGRP-LF effectué sur des dissections de différents tissus, indique que ce PGRP est exprimé de façon ubiquitaire dans l'ensemble des tissus larvaires.

C. Il apparaît d'autre part que PGRP-LF est exprimé à un niveau basal, et que sa traduction n'est pas augmentée suite à une infection (*E. coli*).

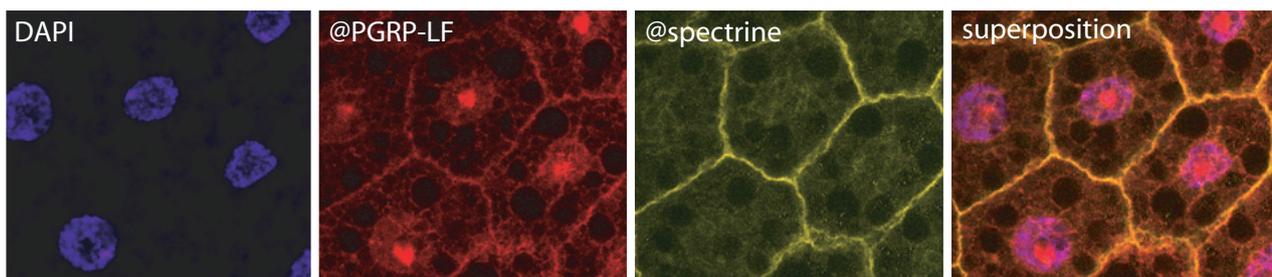


Figure 20. Localisation cellulaire de la protéine PGRP-LF au niveau du corps gras larvaire.

Un immunocytochimisme de la protéine PGRP-LF effectué sur des cellules du corps gras larvaire montre que la protéine est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique comme l'indique la colocalisation avec la spectrine. On observe également une localisation plus inattendue au niveau du nucléole. Le DAPI permet le marquage de l'ADN nucléaire.

I. Résultats

A. Locus génétique et protéine PGRP-LF

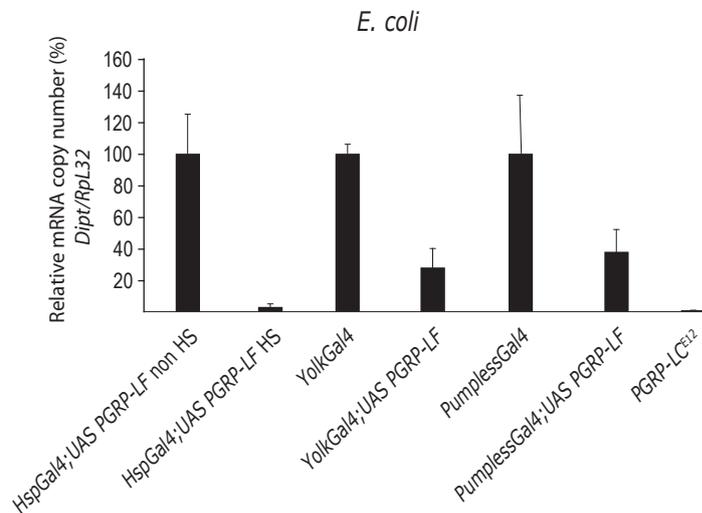
Le gène *PGRP-LF* (*CG4437*) est situé sur le chromosome 3 en position 67A à proximité du locus de *PGRP-LC*. Les bases de données indiquent l'existence d'un seul type de transcrit, composé de 4 exons et 3 introns, codant pour une seule isoforme, la protéine PGRP-LF. D'un poids moléculaire de 42 kDa, cette protéine est composée de deux domaines PGRPs extra-cytoplasmiques, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intra-cytoplasmique très court (24 acides aminés) (Figure 18). Il est intéressant de souligner que les structures primaires des deux domaines PGRPs de PGRP-LF sont très proches de celui de PGRP-LC_a pour l'un et de celui de PGRP-LC_x pour l'autre (cf. Article PGRP-SC1/2, Figure S2).

B. Expression de PGRP-LF

Pour déterminer les domaines d'expression de PGRP-LF, nous avons réalisé un immunomarquage sur des dissections de différents tissus larvaires, avec un anticorps dirigé contre un épitope de 20 acides aminés situés au sein du deuxième domaine PGRP de PGRP-LF (Figure 18). Ne disposant pas de mutant qui ne produit plus la protéine, nous avons vérifié dans un premier temps la spécificité de reconnaissance de cet anticorps en sur-exprimant, dans des cellules S2, une version «taguée» (tag FLAG) de PGRP-LF, et en réalisant un immunomarquage en parallèle avec l'anticorps anti-FLAG, et avec notre anticorps anti-PGRP-LF (Figure 19.A).

La protéine PGRP-LF présente une expression ubiquitaire dans l'ensemble des tissus larvaires que nous avons testé (Figure 19.B). Egaleme nt exprimée chez l'adulte de façon constitutive, PGRP-LF n'est pas augmenté suite à une infection (Figure 19.C). D'autre part, un immunocytomarquage permettant de visualiser la localisation subcellulaire de PGRP-LF, confirme qu'il s'agit bien d'une protéine associée à la membrane cytoplasmique (Figure 20). De façon plus surprenante, il a été observé dans la plupart des tissus examinés, une localisation nucléolaire de PGRP-LF (co-localisation avec la protéine nucléolaire Fibrillarine, non présenté) (Frédéric Maillet, communication personnelle).

A.



B.

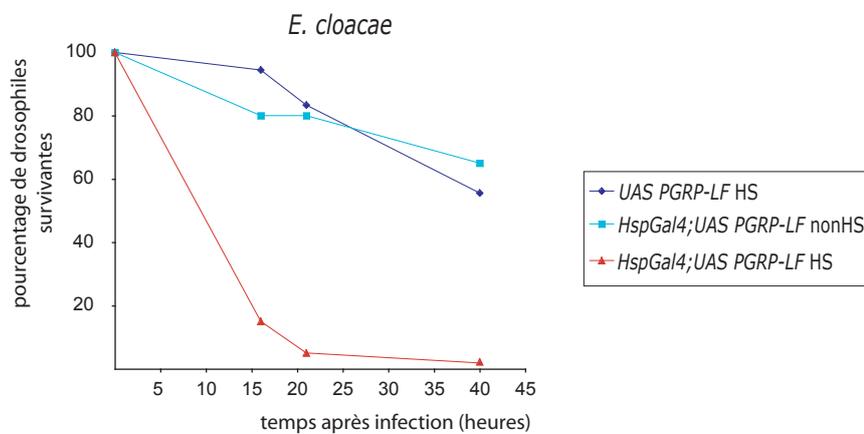


Figure 21. La surexpression de PGRP-LF bloque l'induction de la diptéricine et sensibilise fortement les drosophiles à une infection.

A. La surexpression de PGRP-LF, de façon ubiquitaire (pilote *HspGal4*) grâce à un choc thermique, ou spécifiquement dans le corps gras (pilotes *YolkGal4* et *PumplessGal4*), bloque totalement ou partiellement l'activation de la voie IMD suite à une infection par *E. coli*.

B. La surexpression de PGRP-LF sensibilise également fortement les drosophiles à une infection par une bactérie à Gram-négatif comme *E. cloacae*.

C. La surexpression de PGRP-LF bloque l'induction de la voie IMD

Nous avons voulu déterminer si la surexpression de PGRP-LF induit, comme celle de la version dominant-négatif de PGRP-LC, un blocage de la voie IMD. La quantification par Q-RT-PCR des transcrits *diptericine* indique que la surexpression de PGRP-LF a également un effet dominant négatif sur la voie IMD. En effet, que ce soit avec un transgène pilote *HeatshockGal4* (*HspGal4*) permettant une surexpression ubiquitaire suite à un choc thermique, ou avec des transgènes pilotes spécifiques du corps gras (*YolkGal4* et *PumplessGal4*), la surexpression de PGRP-LF limite très fortement l'induction de la voie IMD suite à une infection (Figure 21.A). La diminution de *diptericine* observée dans les drosophiles *HspGal4;UAS PGRP-LF* ayant subi un choc thermique, est d'ailleurs en parfaite corrélation avec leur forte susceptibilité à une infection par la bactérie à Gram-négatif *E. coli* *cloacae* (Figure 21.B).

Ces expériences de gain de fonction nous donnent des indications intéressantes sur le rôle potentiel de PGRP-LF comme régulateur négatif de la voie IMD. Cependant leur signification biologique reste limitée par le caractère «non physiologique» des taux de protéines produits par ces surexpressions. Il nous a donc paru essentiel de pouvoir suivre les conséquences d'une perte ou d'une diminution de l'expression de *PGRP-LF* sur la voie IMD, et de manière plus générale sur la réponse immunitaire de la drosophile.

D. La diminution du taux de PGRP-LF induit l'activation de la voie IMD, indépendamment de toute infection

1. Etablissement d'une lignée de drosophiles permettant la réduction du taux de transcrit de *PGRP-LF*

Nous ne disposions pas de lignée de drosophiles portant une mutation perte de fonction pour *PGRP-LF*. Nous avons donc entrepris la construction d'une lignée transgénique permettant l'extinction transcriptionnelle de ce gène grâce au mécanisme d'interférence à l'ARN. De la même manière que pour générer les lignées *UAS iPGRP-SC*, nous avons cloné une séquence de *PGRP-LF* (l'exon 4 qui code pour le deuxième domaine PGRP) en orientation sens et antisens dans le vecteur pJM1084 (cf. Article PGRP-SC1/2, Materials and

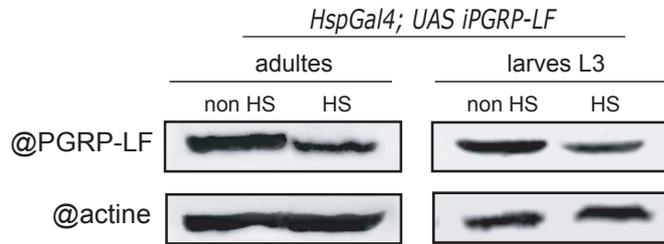


Figure 22. Diminution du taux de la protéine PGRP-LF dans des drosophiles *HspGal4; UAS iPGRP-LF*.

Ces immunocytomarquages indiquent que le taux de protéine PGRP-LF est réduit environ de moitié dans des individus, larves ou adultes, *HspGal4; UAS iPGRP-LF* ayant subi un choc thermique (HS: 2 x 45 minutes à 37°C).

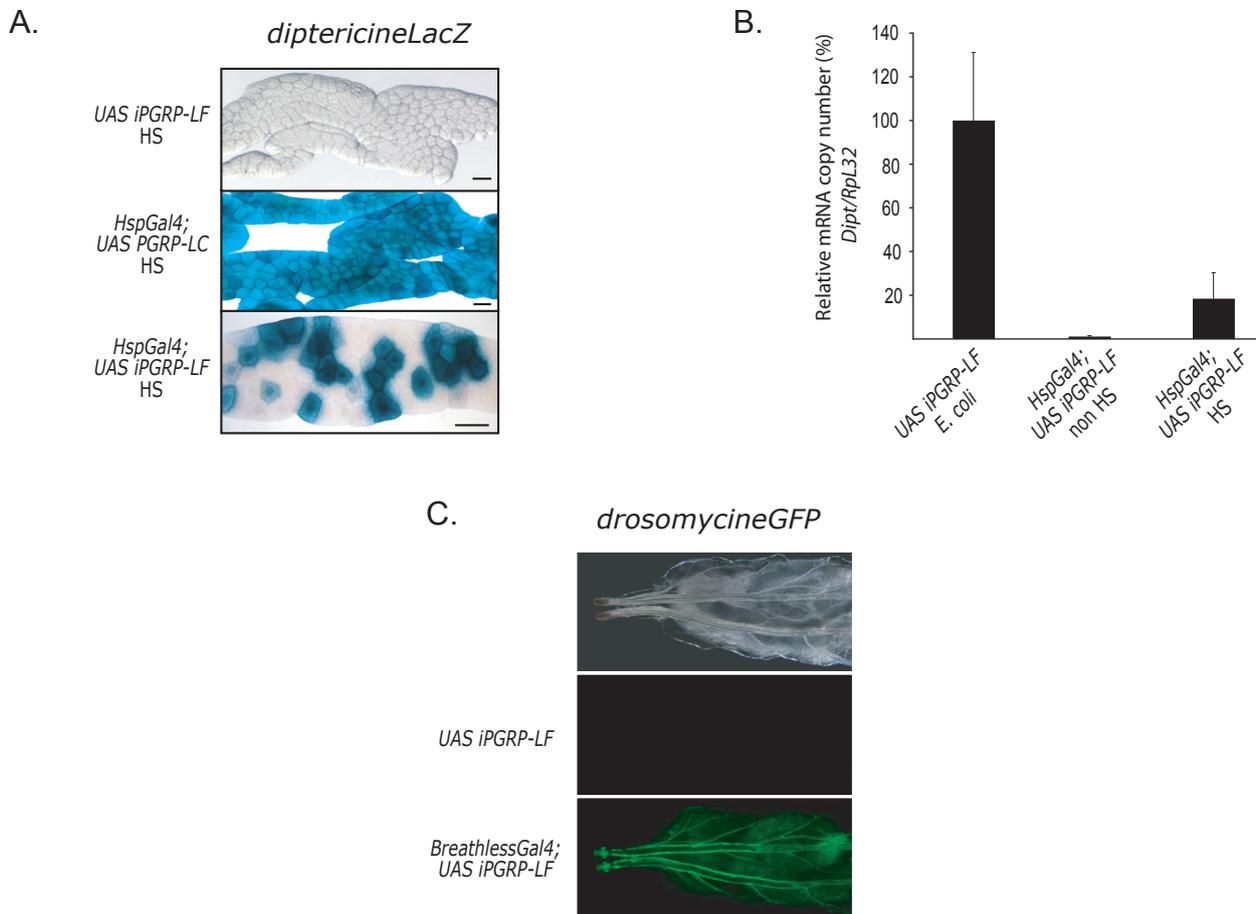


Figure 23. La diminution du taux de PGRP-LF induit l'activation de la voie IMD.

A. Suite à un choc thermique on observe, dans certaines cellules du corps gras de larves *HspGal4; UAS iPGRP-LF*, une activation de la *dipéricine* (visualisée par le transgène rapporteur *dipLacZ*). Cette induction est moins importante que celle observée après une surexpression de PGRP-LC. (HS: 30 min à 37°C).

B. La quantification par Q-PCR du nombre de transcrits de la *dipéricine* indique que l'activation de la voie IMD induite par la diminution de PGRP-LF correspond à 20% de l'activation observée suite à une infection par *E. coli*. (HS: 30 min à 37°C).

C. L'activation de la *drosomycine* dans les trachées (visualisée par le transgène rapporteur *drosomycine-GFP*) indique que la diminution de PGRP-LF dans ce tissu (obtenue grâce au transgène pilote spécifique des trachées *breathlessGal4*), permet également l'activation de la voie IMD dans le cadre de la réponse locale.

Methods). Afin d'évaluer la diminution du taux de PGRP-LF, obtenue après avoir induit ce mécanisme d'interférence à l'ARN, nous avons effectué un immunomarquage (Figure 22). Comme on peut le constater, des larves de troisième stade ou des adultes *HspGal4;UAS iPGRP-LF* ayant subi un choc thermique, présentent une réduction du taux de PGRP-LF que l'on peut évaluer à 50%.

2. Effets de la réduction de PGRP-LF sur l'induction des peptides antimicrobiens

En croisant cette lignée *HspGal4;UAS iPGRP-LF* avec une lignée de drosophiles portant un transgène rapporteur *diptericine-LacZ*, nous avons pu visualiser les conséquences de la réduction du taux de PGRP-LF sur l'activation de la voie IMD. Il apparaît qu'en l'absence de toute infection, la réduction du niveau de PGRP-LF suffit à provoquer une activation constitutive du promoteur de la *diptericine* (Figure 23.A). Cette induction est cependant moins importante que celle induite par la surexpression de PGRP-LC. La quantification par RT-Q-PCR effectuée sur des drosophiles adultes, montre que cette induction de *diptericine* correspond à 20% de celle qui peut être mesurée 6 heures (correspondant à l'induction maximale) après une infection à *E. coli* (Figure 23.B).

Il a également été démontré que lors de la réponse immunitaire locale, notamment au niveau des trachées, la voie IMD contrôle la régulation transcriptionnelle de la *drosomycine* (Tzou et al., 2000). Nous avons donc suivi les effets de la réduction de PGRP-LF dans ce tissu (grâce à un transgène pilote spécifique des trachées *breathlessGal4*), sur l'induction de la *drosomycine* (dans des larves *drosomycineGFP*). Comme pour la *diptericine* dans le corps gras, le gène de la *drosomycine* se trouve induit dans les trachées par une réduction de PGRP-LF dans ce tissu (Figure 23.C).

Afin de déterminer si l'induction de la *diptericine* (et de la *drosomycine* lors de la réponse locale) peut réellement être attribuée à une activation de la voie IMD, nous avons suivi l'induction de la *diptericine* dans les contextes génétiques mutants pour différents membres de la voie IMD (PGRP-LC, DREDD, TAK1, IKK γ) pour lesquels la voie IMD est bloquée suite à une infection. De façon très surprenante, aucun de ces contextes mutants n'a permis de supprimer l'induction de *diptericine* suite à la réduction du taux de PGRP-LF. Ces résultats indiquent que, soit la voie PGRP-LC/IMD n'est pas responsable de l'activation

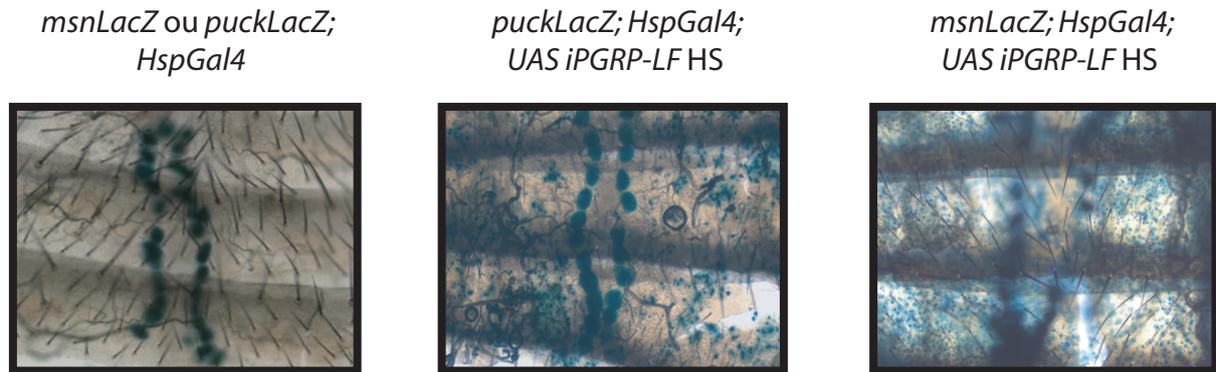


Figure 24. La diminution du taux de PGRP-LF chez l'adulte induit l'activation de la voie JNK.

L'activation de la voie JNK est visualisée grâce aux transgènes rapporteurs *msnLacZ* et *puckLacZ*. *HspGal4*. La réduction du taux de PGRP-LF dans les drosophiles *puckLacZ; HspGal4; UAS iPGRP-LF* et *msnLacZ; HspGal4; UAS iPGRP-LF* ayant subi un choc thermique, induit l'activation de la voie JNK au niveau du corps gras. (HS: 2 x 45min à 37°C), (on peut noter un marquage aspécifique des cellules péri-cardiales bordant le vaisseau dorsal)

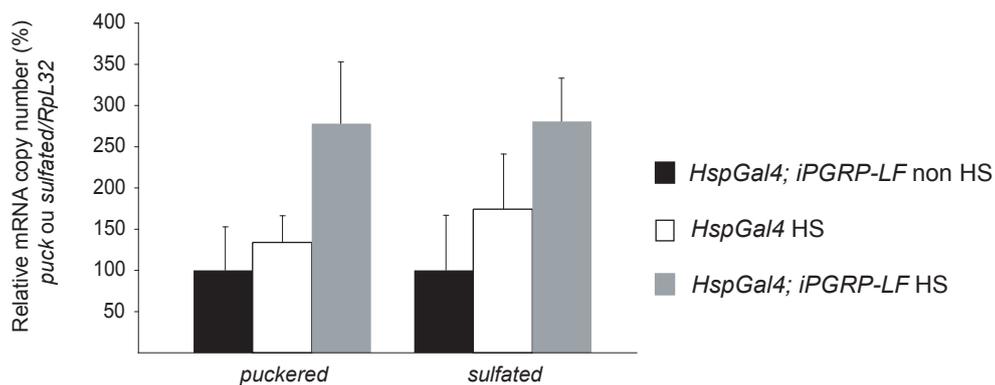


Figure 25. La diminution du taux de PGRP-LF chez la larve induit l'activation de la voie JNK.

Quantification par RT-Q-PCR des transcrits de *puckered* et *sulfated*, gènes cibles de la voie JNK. La réduction du taux de PGRP-LF dans des larves *HspGal4; UAS iPGRP-LF* ayant subi un choc thermique, induit l'activation de la voie JNK, mesurée ici sur des larves L3 entières. (HS: 45min à 37°C).

transcriptionnelle de la *dipéricine* observée, soit que cette voie n'est pas la seule à subir les effets de PGRP-LF. Pour pouvoir définitivement écarter l'implication de la voie IMD dans cette activation de la *diptéricine*, il faudrait néanmoins tester le mutant pour le facteur de transcription NF- κ B Relish ainsi qu'un double mutant *PGRP-LC/PGRP-LE*. En effet, la surexpression de PGRP-LE est également capable d'induire la transcription de la *dipéricine* (Takehana et al., 2002). Ces tests d'épistasie sont en cours actuellement.

Nous avons également voulu déterminer dans quelle mesure la diminution du taux de PGRP-LF pouvait activer une autre voie de signalisation. Il a été démontré que la voie JNK est activée suite à une infection (Brennan and Anderson, 2004). Deux études indiquent également que la voie JNK est impliquée dans la régulation transcriptionnelle des peptides antimicrobiens, dont la diptéricine et l'attacine (Delaney et al., 2006; Kallio et al., 2005). Il nous a donc paru très important de tester si la diminution de PGRP-LF est capable de déclencher l'induction de la voie JNK.

E. La diminution de PGRP-LF induit une activation de la voie JNK, indépendamment de toute infection

Afin de tester l'activation de la voie JNK, nous avons placé la lignée *HspGal4;UAS iPGRP-LF* dans un contexte génétique disposant des transgènes rapporteurs *misshappenLacZ* ou *puckeredLacZ*. Ces deux transgènes permettent de suivre l'activation du promoteur de deux gènes régulés par la voie JNK. La diminution du taux de protéines PGRP-LF induit l'expression des deux transgènes rapporteurs dans le corps gras adulte, reflétant l'activation de la voie JNK (Figure 24). Nous avons également tenté d'évaluer le niveau d'activation de la voie JNK chez la larve, par la quantification des transcrits de *puckered* et de *sulfated* (également gène cible de cette voie) (Silverman et al., 2003). La quantification de ces deux transcrits sur les larves de troisième stade, montre que la réduction du taux de PGRP-LF augmente leur expression d'un facteur 2,5. La voie JNK est donc également activée chez la larve suite à la réduction de PGRP-LF (Figure 25).

L'ensemble de nos résultats nous permettent de proposer que PGRP-LF est un régulateur négatif à la fois de la voie IMD et de la voie JNK. Comme nous l'avons déjà montré au cours de notre travail sur PGRP-SC, une régulation très fine de la voie IMD semble

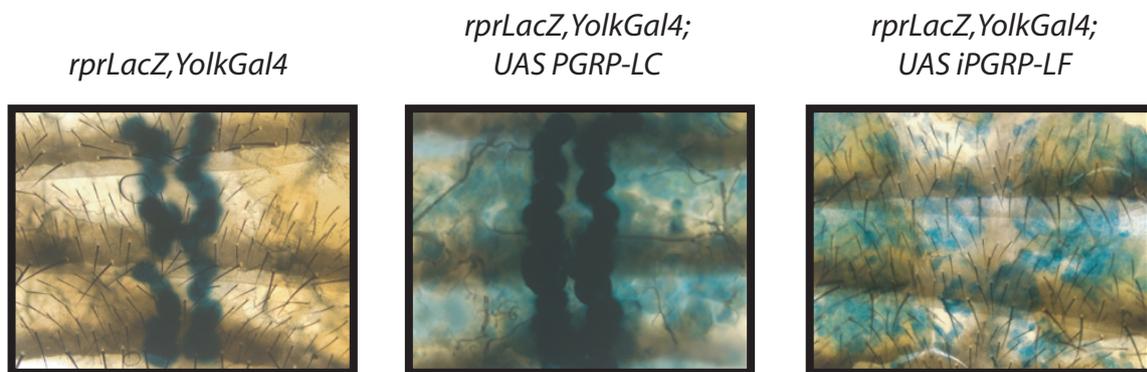


Figure 26. La diminution du taux de PGRP-LF chez l'adulte induit l'activation du gène pro-apoptotique *reaper*.

L'activation du gène *reaper* (*rpr*) est visualisée grâce au transgène rapporteur *rprLacZ*. La réduction du taux de PGRP-LF dans le corps gras de drosophiles *YolkGal4; UAS iPGRP-LF* (grâce au transgène pilote spécifique du corps gras *YolkGal4*) induit l'activation du promoteur du gène *reaper* dans les cellules du corps gras, de façon comparable à ce qui est observé en surexprimant PGRP-LC. (Le marquage aspécifique des cellules bordant le vaisseau dorsal n'est pas observé pour *rprLacZ, YolkGal4; UAS iPGRP-LF*, ces cellules péricardiales ayant été enlevées lors de la dissection)

nécessaire au cours du développement larvaire. Nous avons donc voulu savoir si la réduction du taux de PGRP-LF a également des conséquences sur le développement larvaire.

F. La diminution de PGRP-LF induit des défauts de développement

1. Le gène pro-apoptotique *reaper* est activé par la diminution du taux de PGRP-LF

Nous avons montré que la voie JNK est activée par la diminution de PGRP-LF. Certains gènes régulés par cette voie sont directement liés à l'induction de l'apoptose. Nous avons cherché à savoir si *reaper*, l'un de ces gènes, est induit par la réduction de PGRP-LF). L'induction de la protéine pro-apoptotique Reaper dans une cellule est un indicateur intéressant de son activité apoptotique (cf. Introduction II.E.3). Nous avons utilisé une souche de drosophiles disposant d'un transgène *reaperLacZ* et du transgène pilote spécifique du corps gras *YolkGal4*. Il a été démontré que la surexpression de la voie IMD dans le corps gras induit l'activation transcriptionnelle de *reaper* dans ce tissu (Georgel et al., 2001). Nous avons donc comparé les effets de la surexpression de PGRP-LC et ceux de la diminution de PGRP-LF sur l'activité du promoteur de *reaper*. Comme on peut le voir sur ces cuticules de drosophiles adultes, le gène *reaper* se trouve être activé dans le corps gras suite à la diminution du taux de la protéine PGRP-LF (Figure 26).

Le mécanisme d'apoptose a un rôle fondamental au cours du développement (Danial and Korsmeyer, 2004). Nous avons donc cherché à mettre en évidence le rôle potentiel de PGRP-LF, via la régulation des voies IMD et/ou JNK, au cours du développement larvaire.

2. La diminution du taux de PGRP-LF provoque des défauts de développement

Afin de tester l'hypothèse d'une implication de PGRP-LF au cours du développement, nous avons diminué le taux de PGRP-LF dans différents compartiments cellulaires du disque imaginal de l'aile et suivi les conséquences de cette réduction sur la morphologie de l'aile au stade adulte.

Nous avons utilisé différents transgènes pilotes *-Gal4* Ils ont tous donné des résultats similaires, mais pour simplifier la présentation des résultats, j'ai décidé de ne présenter que

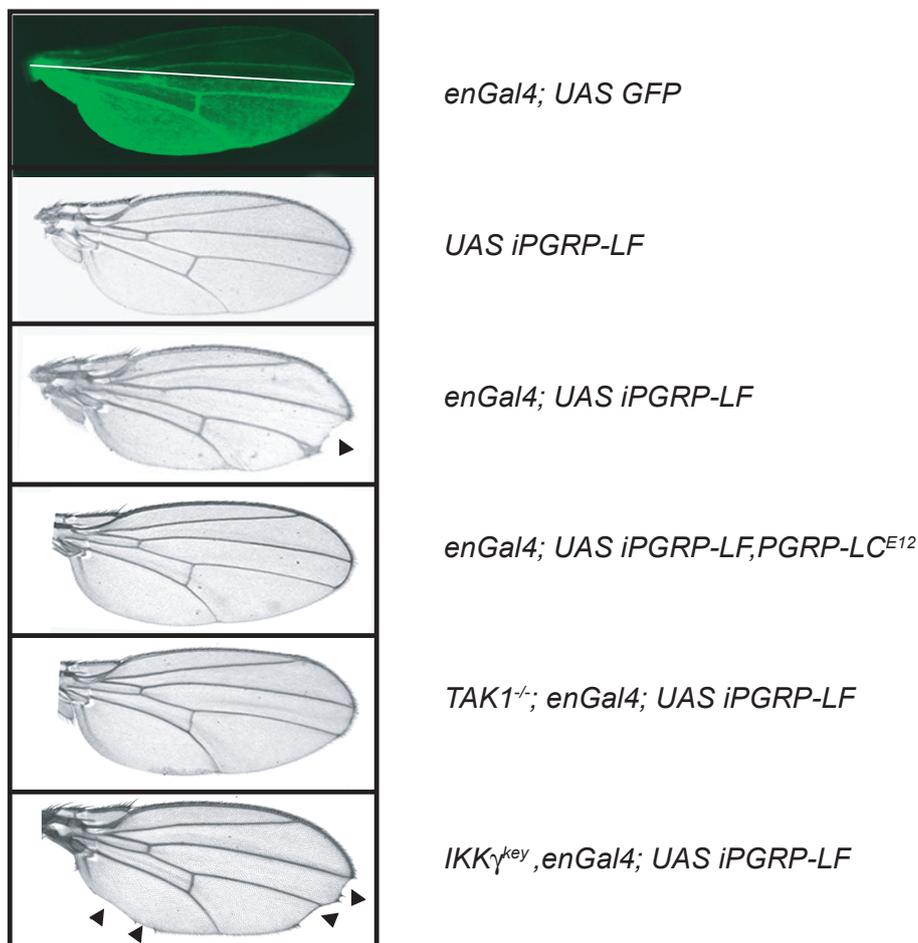


Figure 27. La réduction de PGRP-LF dans le compartiment postérieur de l'aile pendant son développement, induit l'apparition d'indentations dans cette zone dans l'aile adulte.

Le transgène pilote *engrailedGal4* permet d'exprimer un transgène sous contrôle du promoteur *UAS*, dans toute la partie postérieure de l'aile, dès le début de son développement au stade de disque imaginal. La diminution de PGRP-LF dans cette zone postérieure induit la formation d'indentations, visibles une fois la mouche sortie de sa puppe (pointe de flèche). La survenue de ces indentations est supprimée dans les contextes mutants pour *PGRP-LC* et *TAK1*, mais est aggravée en un contexte mutant *IKKγ*.

valeurs indiquées en pourcentage du nombre total de drosophiles observées (n)	25°C	29°C	<i>E. coli</i> 25°C
<i>UAS iPGRP-LF</i>	0% (102)	0% (50)	0% (35)
<i>enGal4</i>	0% (78)	0% (50)	0% (40)
<i>enGal4; UAS iPGRP-LF</i>	2% (228)	61% (82)	52% (31)
<i>enGal4; UAS iPGRP-LF, PGRP-LC^{E12}</i>	0% (236)	0% (85)	0% (28)
<i>TAK1^{-/-}; enGal4; UAS iPGRP-LF</i>	0% (87)	0% (41)	

Figure 28. Pourcentage de drosophiles présentant un phénotype d'indentations.

Ce tableau indique pour chaque génotype, le pourcentage d'indentations observé chez des drosophiles ayant ou non subi une réduction au stade larvaire de PGRP-LF dans le domaine d'expression de *engrailed*. On observe qu'à 29°C, température à laquelle l'expression de Gal4 est potentiellement plus forte, le phénotype est beaucoup plus marqué. Après une infection naturelle par des bactéries *E. coli* au stade larvaire, on observe une très forte aggravation du phénotype d'indentation causé par la diminution de PGRP-LF.

les résultats obtenus avec le transgène pilote *enGrainedGal4* (*enGal4*) qui permet d'exprimer un transgène *UAS* dans le compartiment postérieur de l'aile (Figure 27).

La diminution de PGRP-LF sous le contrôle du pilote *enGal4*, provoque des indentations dans la partie postérieure de l'aile adulte (Figure 27). Ce phénotype s'observe avec une fréquence variable selon la température à laquelle sont placés les individus. L'efficacité du système *UAS/Gal4* dépend de la température, et permet a priori une surexpression plus forte à 29°C qu'à 25°C. Ainsi à 29°C, température à laquelle les effets sont les plus importants, on observe qu'environ 60% des drosophiles présentent une indentation dans la partie distale du compartiment postérieure de l'aile (Figure 28).

Nous avons également suivi les effets de la diminution de PGRP-LF dans différents contextes mutants. Il apparaît ainsi que les mutations *PGRP-LC* ou *TAK1* suffisent à bloquer ce phénotype d'indentation. A l'inverse, la mutation *key* de la sous-unité IKK ne permet pas de contrer l'apparition des indentations, mais au contraire semble aggraver ce phénotype. Ces différents résultats indiquent que la voie JNK et la voie IMD sont toutes deux impliquées, par l'intermédiaire de TAK1, dans les mécanismes responsables du phénotype d'indentation observé. L'activation NF- κ B de la voie IMD jouerait un rôle de rétro contrôle de l'activation de la voie JNK, en activant la dégradation de TAK1 (Park et al., 2004).

Comme nous l'avons déjà évoqué, les effets observés suite à la réduction de PGRP-LF s'observent en absence de toute infection, ce qui permet de proposer que cette protéine agit indépendamment de la reconnaissance du PGN. Nous nous sommes cependant demandés si l'activité de PGRP-LF était vraiment indépendante de tout contexte infectieux. Nous avons donc suivi le phénotype d'indentation apparaissant chez des mouches *enGal4;UAS iPGRP-LF* ayant subi une infection naturelle par la bactérie à Gram négatif *E. coli* au stade larvaire. Il apparaît de façon évidente que l'infection augmente très fortement le phénotype avec 52% des mouches présentant des indentations à 25°C (Figure 28). La forte augmentation des indentations après l'infection n'est pas observée en absence de PGRP-LC. Le rôle de PGRP-LF en réponse à la présence de PGN semble donc être directement lié à sa régulation négative du récepteur PGRP-LC.

Ce résultat indique qu'en plus d'un rôle indépendant de l'infection, la capacité théorique de PGRP-LF à reconnaître le PGN a une importance dans la régulation négative de la voie PGRP-LC/IMD, dans le cadre d'une infection chez la larve.

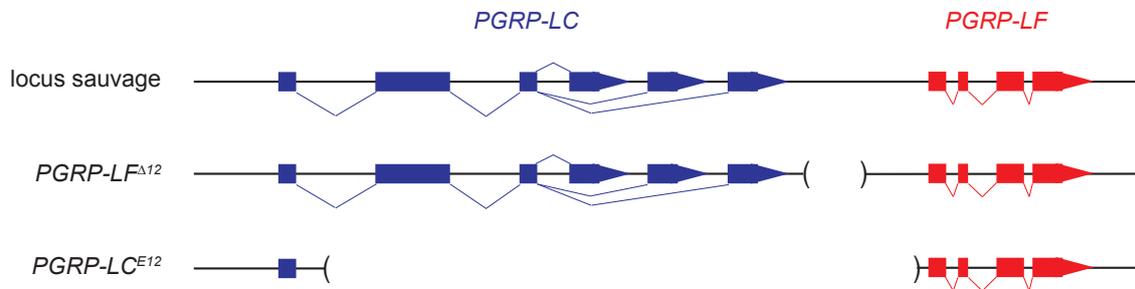


Figure 29. Structure des locus mutants de *PGRP-LC^{E12}* et *PGRP-LF^{Δ12}*.

Les gènes *PGRP-LC* et *PGRP-LF* sont situés sur un locus d'environ 10 kilobases. Le mutant *PGRP-LF^{Δ12}* présente une délétion de 260 paires de bases dans la région promotrice de *PGRP-LF*. La mutation *PGRP-LC^{E12}* est une délétion de tout le gène ainsi que de la région promotrice de *PGRP-LF*.

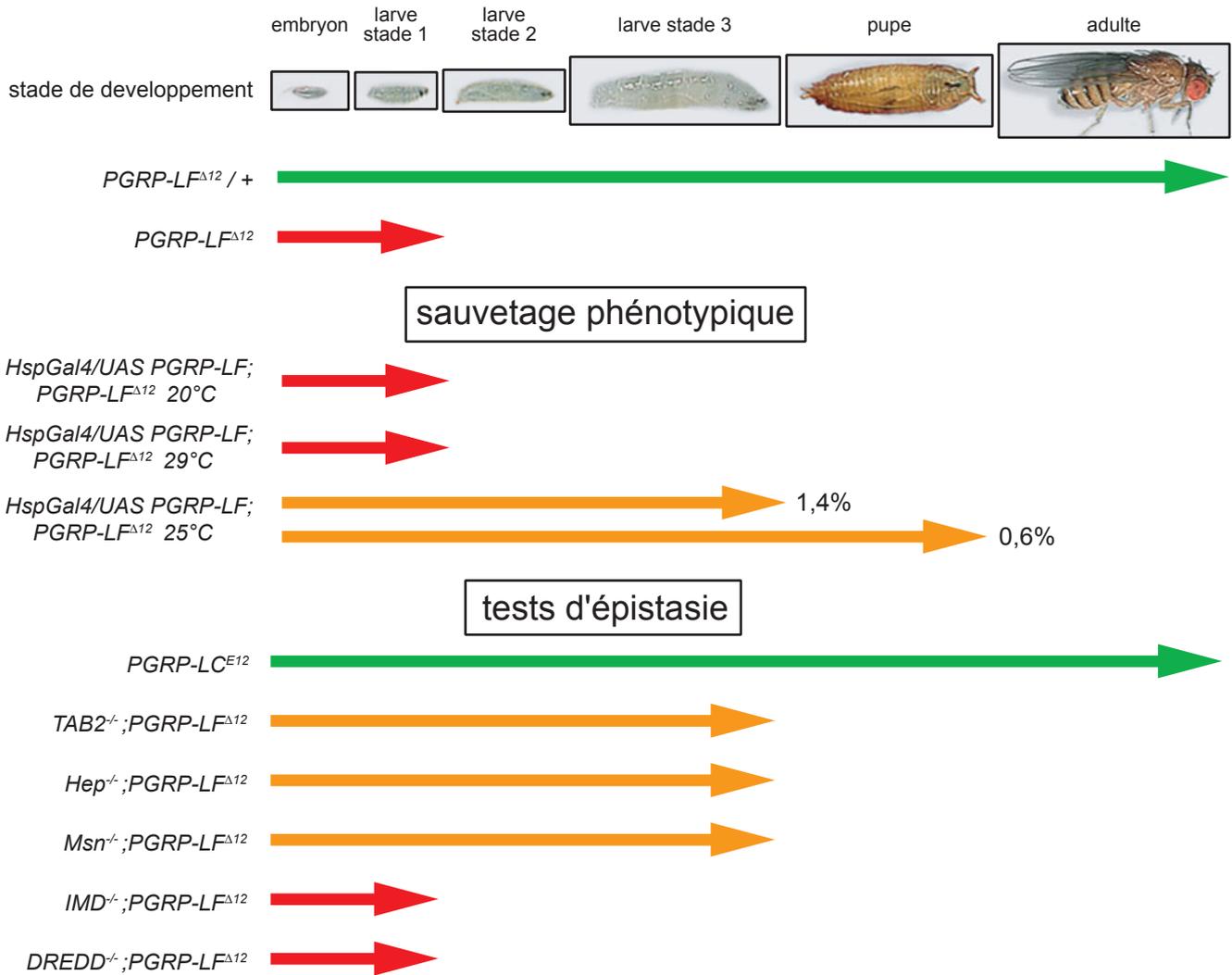


Figure 30. Effet de la mutation *PGRP-LF^{Δ12}* sur le développement larvaire.

La mutation *PGRP-LF^{Δ12}* bloque le développement au premier stade larvaire. La surexpression de *PGRP-LF* permet un sauvetage partiel de ce blocage jusqu'au troisième stade larvaire pour 1,4% des individus et jusqu'au stade pupal dans 0,6% des cas. Les analyses d'épistasie indiquent que seul le contexte mutant pour *PGRP-LC* permet un sauvetage total de la létalité larvaire. Les mutants *TAB2*, *hemipterous* et *misshappen* ne permettent un sauvetage que jusqu'au troisième stade larvaire. Les mutants *IMD* et *DREDD* ne permettent par contre aucun sauvetage de la létalité liée à la mutation *PGRP-LF^{Δ12}*.

Ces lignées de drosophiles permettant une diminution d'environ 50% du taux de protéine PGRP-LF, nous ont permis d'appréhender le rôle de cette protéine dans la régulation des voies IMD et JNK. A ce stade cependant, l'analyse d'un mutant permettant d'obtenir une perte de fonction totale devrait nous permettre de progresser dans la compréhension du rôle exact joué par PGRP-LF.

G. Analyse d'un mutant de régulation de *PGRP-LF*

1. Un mutant hypomorphe présentant une délétion dans la région promotrice de *PGRP-LF*, provoque la létalité au premier stade larvaire

Nous avons obtenu (par le biais d'une collaboration) la lignée de drosophiles *PGRP-LF*⁰¹² qui présente une délétion de 260 paires de bases, localisée environ 750 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription de *PGRP-LF* (Figure 29)([Frédéric Maillat](#), communication personnelle). De façon très intéressante, le développement de 100% des larves homozygotes se trouve être bloqué au premier stade larvaire. Cependant, nous n'avons pour le moment pas réussi à détecter de diminution notable du taux de protéine PGRP-LF dans des larves de premier stade, avant la létalité (par immunomarquage, résultats non présentés). Une approche par immunocytochimie n'a pas davantage permis l'identification d'un tissu dans lequel le taux de PGRP-LF chez ces mutants serait éventuellement diminué. Néanmoins, il paraît cependant fort probable que la létalité soit liée à une dérégulation de PGRP-LF au sein d'un tissu dans lequel elle est nécessaire à ce stade de développement. Enfin, on ne peut pas exclure que la délétion interfère avec la régulation d'autres gènes du locus, et que la létalité ne soit pas liée à la potentielle diminution de PGRP-LF.

Afin de vérifier que c'est bien la diminution du taux de PGRP-LF qui est à l'origine de la létalité, nous avons tenté de sauver ce phénotype en sur-exprimant le cDNA de *PGRP-LF* de manière ubiquitaire, avec le transgène pilote *HspGal4*. L'expression maximale induite par ce promoteur est obtenue à 37°C, mais afin d'éviter une expression trop forte de PGRP-LF (qui peut également être létale), nous avons placé les individus à des températures de 20 à 29°C, de manière à permettre des niveaux d'expression variés. Les résultats préliminaires présentés sous forme d'un schéma indiquent qu'une surexpression modérée de PGRP-LF permet le développement des larves jusqu'au stade pupal (Figure 30). Le pourcentage

d'individus «sauvés» est néanmoins très faible et il serait important de pouvoir déterminer les conditions optimales de surexpression de PGRP-LF permettant le sauvetage d'un plus grand nombre de larves. Quoiqu'il en soit, cette expérience apporte la preuve que la létalité au premier stade larvaire, observée dans les mutant PGRP-LF^{Δ12}, est bien due à une baisse du taux de la protéine PGRP-LF.

2. Analyse épistatique du mutant PGRP-LF^{Δ12}

Les résultats des expériences d'épistasie réalisées avec les mouches *enGal4;UAS iPGRP-LF* indiquent que PGRP-LF joue un rôle de régulateur négatif en agissant vraisemblablement au niveau du récepteur PGRP-LC.

Nous avons étendu notre analyse épistatique à plusieurs autres contextes mutants, en cherchant à savoir si la létalité causée par la mutation *PGRP-LF^{Δ12}* pouvait être supprimée. Nous avons ainsi réalisé les tests d'épistasie avec *TAK1*, *TAB2*, *Hemipterous*, *Misshappen*, *IMD*, *DREDD* et *PGRP-LC^{E12}* (Figure 30). La mutation *PGRP-LC^{E12}* est une délétion complète du locus de *PGRP-LC*. La caractérisation moléculaire précise de cette délétion indique qu'une grande partie de la région promotrice de PGRP-LF est également absente (Frédéric Maillet, communication personnelle)(Figure 29). La région du promoteur de *PGRP-LF* absente chez le mutant *PGRP-LF^{Δ12}*, l'est donc également chez le mutant *PGRP-LC^{E12}*. Ces mouches étant viables, il apparaît que la mutation *PGRP-LC^{E12}* permet de sauver totalement le phénotype mutant *PGRP-LF^{Δ12}*. L'épistasie entre les mutants *TAK1* et *PGRP-LF^{Δ12}* ont donné des résultats contradictoires. Il n'est donc pour l'instant pas possible de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus par l'approche d'interférence à l'ARN. Les analyses épistatiques réalisées avec les mutants *TAB2*, *hemipterous* et *misshappen* ne permettent de sauver la létalité que jusqu'au troisième stade larvaire. Il faut cependant noter que les mutants *misshappen* et *hemipterous* présentent eux-mêmes une létalité à ce stade de développement. Ces résultats confirment les conclusions de l'approche d'interférence à l'ARN, et démontrent l'implication de la voie JNK dans la létalité induite par l'absence de PGRP-LF. D'autre part, le gène *misshappen* étant épistatiquement en amont de *TAK1*, ce résultat démontre que PGRP-LF permet également de réguler négativement cette partie de la voie qui est sous le contrôle du récepteur Wengen (homologue au TNFR1 des mammifères). En revanche, aucun sauvetage n'a été possible avec les mutants pour *DREDD* et *IKK* ce qui confirme l'implication de cette partie de la voie IMD uniquement dans l'activation de NF- κ B.

H. Recherche d'une interaction entre PGRP-LF et PGRP-LC ou Wengen

Il nous a semblé important de déterminer si la fonction inhibitrice de PGRP-LF passe par une interaction avec les récepteurs qu'elle régule. Nous avons établi des lignées cellulaires permettant la surexpression de PGRP-LF marquée par le tag Flag, de PGRP-LC_a marquée par le tag c-Myc, et de PGRP-LC_x marquée par le tag Ha. Aucune des tentatives pour co-immunoprécipiter PGRP-LF, soit avec PGRP-LC_a, soit avec PGRP-LC_x, n'a été fructueuse. Il faut cependant noter que si la quantité de PGRP-LF produite par les cellules S2 transfectées était importante, les conditions de surexpression de PGRP-LC_a et de PGRP-LC_x n'ont jamais permis d'obtenir de grande quantité de ces deux protéines dans les extraits membranaires utilisés pour les expériences de co-immunoprécipitation. D'autre part, nous ne disposons que depuis très récemment d'une lignée cellulaire permettant la surexpression du récepteur Wengen. Il sera donc très intéressant dans le futur de réitérer ces expériences de co-immunoprécipitation, pour vérifier l'existence d'une interaction entre PGRP-LF et ces récepteurs.

II. Discussion

Nous avons réuni un ensemble de données convergentes permettant, même si certaines zones d'ombre subsistent, de proposer un modèle du rôle de régulateur négatif joué par PGRP-LF (Figure 31). Je poserai cependant une hypothèse préalable qui est que, comme c'est le cas pour son homologue mammalien le TNFR1, l'activation du récepteur Wengen est capable dans certaines conditions de déclencher à la fois l'induction de la voie JNK et celle de la voie NF- κ B. Un autre élément à prendre en compte, est que la voie NF- κ B exerce une régulation négative sur la voie JNK, notamment par l'intermédiaire de la dégradation de TAK1 par le protéasome (Park et al., 2004). Il faut enfin avoir conscience que l'activation du facteur de transcription NF- κ B de la voie IMD (Relish), et de ceux de la voie JNK (*d*-Jun et *d*-Fos), se font selon des modalités différentes. La voie IMD aboutit à la phosphorylation puis à la coupure protéolytique irréversible de la sous-unité inhibitrice de Relish, permettant la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B. La voie JNK de son côté aboutit à la phosphorylation des facteurs *d*-Jun et *d*-Fos, phénomène qui est réversible. Cette différence

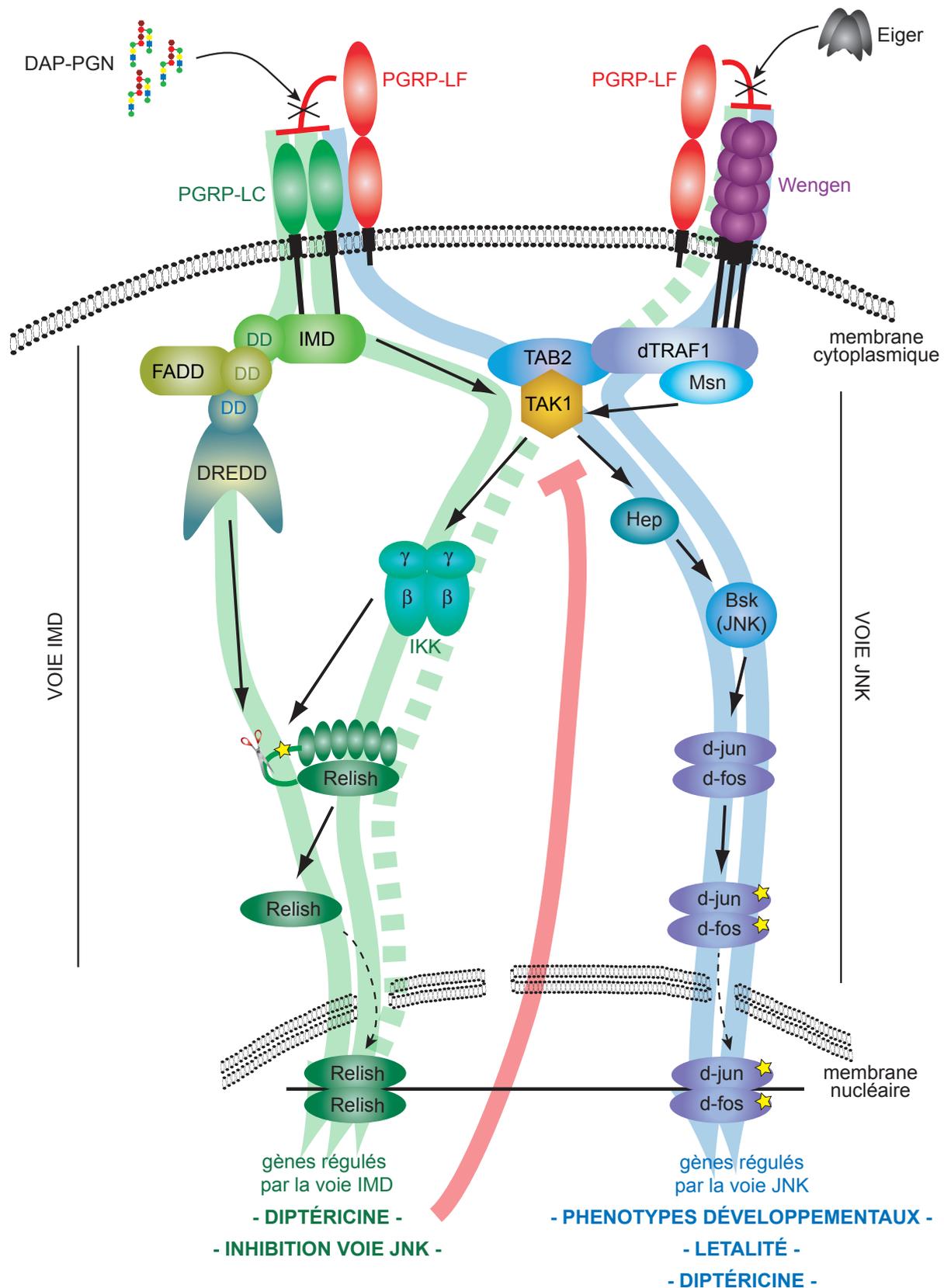


Figure 31. Rôle de PGRP-LF dans la régulation négative des voies IMD et JNK.

Ce modèle permet d'expliquer les différents phénotypes observés suite à la diminution du taux de PGRP-LF, aussi bien dans l'activation transcriptionnelle de la *dipéricine* que dans la létalité et les phénotypes développementaux. Ainsi PGRP-LF permettrait de maintenir les récepteurs PGRP-LC et Wengen dans un état inactif. La présence de ligand, en déplaçant l'équilibre PGRP-LF/Récepteur, induirait en se fixant à son récepteur, l'activation des voies intracytoplasmiques. Les flèches vertes représentent les différentes modalités d'activation de la voie IMD, et les flèches bleues, celles de la voie JNK. (en pointillé: hypothèse)

n'est pas quantifiable, mais doit être prise en compte pour tenter d'évaluer le rôle plus ou moins important de chacune des voies.

Je propose que PGRP-LF, grâce à un niveau de transcription constitutif et une localisation membranaire, permet de garder les récepteurs PGRP-LC et Wengen dans un état inactif en empêchant une éventuelle oligomérisation spontanée. Il a été démontré que PGRP-LC_a et PGRP-LC_x sont capables de former des homo et hétérodimères, mais on ne sait pas pour l'instant quel(s) domaine(s) de PGRP-LC est/sont engagé(s) dans cette interaction, et si la présence de PGRP-LF suffirait à empêcher ce contact (Kaneko et al., 2004).

En présence de PGN, ou du ligand Eiger, je propose que les récepteurs PGRP-LC et Wengen soient libérés de l'influence inhibitrice de PGRP-LF, et que les voies de signalisation soient activées en aval. PGRP-LF reprendrait son rôle de régulateur négatif dès que le taux d'inducteur baisse. Le fait que l'activité transcriptionnelle de *PGRP-LF* soit constitutive et qu'elle ne semble pas être augmentée par une infection, plaide en faveur de ce modèle dans lequel «l'équilibre PGRP-LF/Récepteur inhibé» est uniquement déplacé par la présence du ligand. La très grande homologie structurale entre les domaines PGRP de PGRP-LF et ceux de PGRP-LC_a et PGRP-LC_x laisse penser qu'ils peuvent reconnaître les mêmes PGN. On pourrait alors proposer un mode d'action additionnel par lequel PGRP-LF serait mis en compétition avec PGRP-LC pour la liaison au PGN, limitant ainsi son accès au récepteur.

On peut d'autre part proposer que PGRP-LF joue un rôle secondaire, en complément de celui des PGRP-SC, dans le contrôle de la voie IMD en cas d'infection bactérienne dans le tube digestif. Il est en effet probable que malgré la dégradation du PGN opéré par les PGRPs catalytiques, quelques molécules encore immunogènes se retrouvent dans l'hémolymphe, pouvant alors potentiellement déclencher la voie IMD. Ainsi, PGRP-LF pourrait en bloquant PGRP-LC, ou en séquestrant le PGN, empêcher que cette voie ne soit activée.

Nos données indiquent également que PGRP-LC ne peut être l'unique cible de PGRP-LF, et il est très probable qu'une régulation négative de Wengen/Eiger se produise simultanément. L'absence de données complémentaires ne nous permet à ce stade que de poser des hypothèses. Je propose que PGRP-LF régule négativement le couple Wengen/Eiger, soit en interagissant directement avec le récepteur Wengen, soit en séquestrant le ligand Eiger. Dans les deux cas, l'action de PGRP-LF empêcherait la fixation de Eiger à Wengen, son oligomérisation, et donc l'activation de la voie JNK en aval. Il est d'ailleurs notable que chez les mammifères, les récepteurs DcR1 et 2 disposant d'un domaine intra-cytoplasmique très

court, rentrent en compétition pour le ligand avec des récepteurs DR4 et 5 (Death Receptor, de la famille du TNFR, comme Wengen). Ils sont ainsi capables d'empêcher l'activation du mécanisme d'apoptose normalement déclenché par ces récepteurs DR (Ashkenazi and Dixit, 1999).

Afin de renforcer notre argumentation, il va maintenant être important d'obtenir des données supplémentaires. Ainsi, le sauvetage phénotypique du mutant PGRP-LF¹² obtenu en surexprimant PGRP-LF ne peut être réfuté, mais l'identification de conditions permettant de prolonger le développement d'un nombre plus significatif d'individus serait souhaitable.

Une autre faiblesse de notre argumentation provient du mutant lui-même□ en effet nous ne sommes pour l'instant pas en mesure de déterminer dans quel tissu PGRP-LF est dérégulé. Il serait plus probant d'obtenir les mêmes effets avec un mutant nul, mutant qui est actuellement en train d'être généré (Frédéric Maillet, communication personnelle).

Il serait également important de pouvoir établir un lien entre les phénotypes développementaux observés et l'activation de mécanismes cellulaires comme l'apoptose. Pour cela l'utilisation de lignées récemment établies permettant de générer au sein d'un tissu non muté, un clone de cellules mutantes pour *PGRP-LF*, devrait permettre de mieux appréhender cet aspect du rôle de PGRP-LF. Enfin, comme nous l'avons déjà dit précédemment, il paraît important d'établir, s'ils existent, quels sont les liens biochimiques existant entre PGRP-LF et PGRP-LC/PGN et Wengen/Eiger.

Discussion générale

Discussion générale

L'ensemble des résultats présentés ici, participent à la démonstration établissant le rôle central joué chez la drosophile, par la famille des PGRPs dans la reconnaissance de l'infection bactérienne à travers le PGN, et la régulation de la voie IMD (Figure 32). Il apparaît d'autre part, que chez cet insecte le PGN est le principal MAMP permettant de signaler la présence des bactéries au système immunitaire. Le blocage total de la voie IMD suite à la surexpression des PGRP-SC (Figure 15) semble même indiquer que le PGN est sûrement le seul inducteur de cette voie.

L'étude du rôle de PGRP-SD démontre que la détection des bactéries à Gram-positif nécessite la présence d'au moins 3 PRRs. PGRP-SA et PGRP-SD constituent pour le système immunitaire une sorte de répertoire pour la reconnaissance directe de Lys-PGN différents. Nos résultats ne permettent cependant pas de savoir si ces deux PGRPs sont capables de détecter le PGN de l'ensemble des bactéries à Gram-positif. D'autre part, comme je l'ai évoqué, outre GGBP-1, il est probable qu'une quatrième protéine participe à la transmission du signal de reconnaissance jusqu'à l'activation de la voie Toll.

Il apparaît de plus que la résistance à une infection par la bactérie *S. aureus*, n'est pas dépendante de l'activation des voies Toll ou IMD. Cette observation soulève de nombreuses questions. On peut se demander si la présence de peptides antimicrobiens, qui seraient alors induits indépendamment des voies classiques, est tout de même nécessaire pour la résistance à cette infection. La phagocytose de *S. aureus* est décrite comme étant, pour la drosophile, un mécanisme particulièrement important pour combattre cette bactérie pathogène, même si le rôle proposé de PGRP-SC1 dans ce processus reste à mon sens équivoque (Garver et al., 2006).

Nous démontrons également que l'induction de la voie IMD doit être finement contrôlée pendant le développement larvaire. Nos résultats indiquent que cette régulation peut se faire à deux niveaux.

Une première régulation est effectuée par des PGRPs catalytiques. PGRP-SC1 et PGRP-SC2 qui sont exprimés de manière constitutive, et PGRP-LB qui est induit par la voie IMD après une infection, interviennent comme nous l'avons vu sur le nombre de molécules

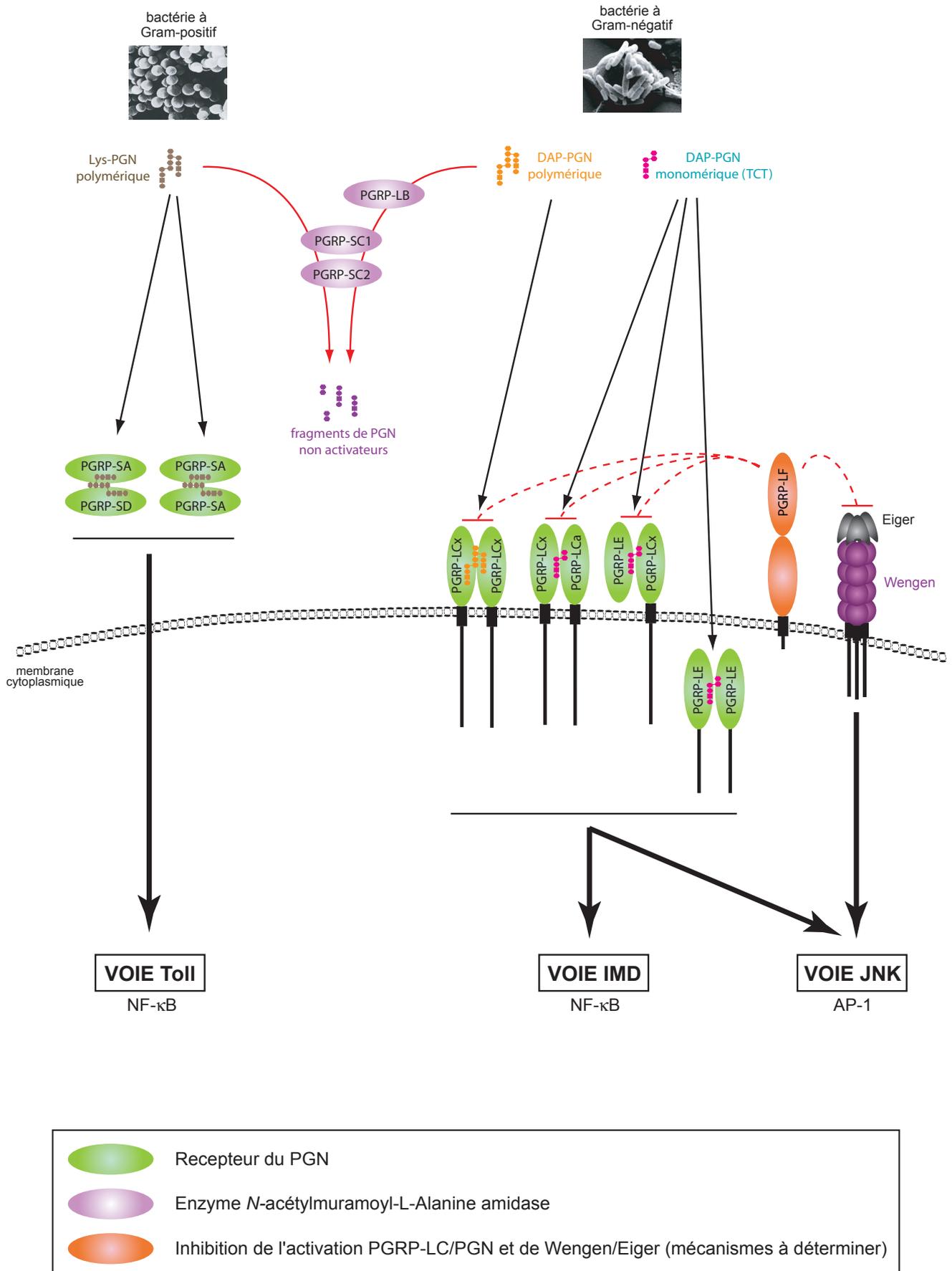


Figure 32. Rôles des PGRPs dans l'activation et la régulation des voies signalisation immunitaire chez la drosophile.

inductrices. Cette régulation catalytique du taux de PGN inducteur, est vraisemblablement effectuée en grande partie au niveau du tube digestif, une des principales surfaces de contact avec les microorganismes. Au stade larvaire, il paraît donc fondamental pour permettre un développement correct de la drosophile, de pouvoir limiter dans le temps l'activation des voies IMD et JNK. Cette régulation continue vraisemblablement à jouer un rôle au stade adulte, notamment au niveau du tube digestif, afin d'éviter que l'induction inutile de la voie IMD et des peptides antimicrobiens ne soit constamment déclenchée par les bactéries ingérées.

Un deuxième contrôle intervient directement sur la capacité du récepteur PGRP-LC à être activé. Nos résultats indiquent que le rôle de PGRP-LF dans ce processus ne se limite pas à PGRP-LC, mais qu'elle permet probablement l'inhibition de Wengen/Eiger. Il paraît donc très important au cours du développement, de pouvoir maintenir ces deux modes d'activation de la voie JNK inactifs.

Le contrôle négatif de PGRP-LC par PGRP-LF interviendrait, soit directement à travers l'interaction de leurs domaines PGRPs, soit via la séquestration par PGRP-LF du PGN. Ces deux hypothèses peuvent être validées par les données biochimiques et structurales existant pour PGRP-LC.

Par contre, nous n'avons pas pour le moment d'hypothèse qui permette d'expliquer sur un plan structural, l'inhibition potentielle de Wengen par PGRP-LF. En effet, les domaines PGRP de PGRP-LF ne présentent pas de similitudes évidentes avec les domaines CRD (Cystein Rich Domain) des TNFRs (Locksley et al., 2001). Il n'est donc pas possible de prédire d'interaction entre PGRP-LF et un récepteur de type TNFR ou un ligand de type TNF.

Nos données expérimentales indiquent que PGRP-LF exerce principalement son rôle d'inhibiteur en dehors de tout contexte infectieux, et donc a priori indépendamment du PGN. Cependant, même en l'absence d'infection, il est possible que les bactéries présentes dans le tube digestif libèrent plus de PGN que ne peuvent en dégrader les PGRP-SC. PGRP-LF jouerait alors en fait un rôle dépendant de ce PGN activateur présent dans l'hémolymphe, en le séquestrant et empêchant qu'il active PGRP-LC. La question de l'inhibition de Wengen reste à nouveau plus complexe à comprendre, le PGN n'étant a priori pas capable d'activer ce récepteur.

Les données actuelles indiquent que les PGRPs de mammifères ne semblent pas jouer un rôle de PRR vis-à-vis du PGN. En effet, seuls NOD1 et NOD2 induisent la production de cytokines en réponse à la présence (intra-cytoplasmique) de ce MAMP. Les PGRPs de mammifères ont plus vraisemblablement des fonctions bactéricides et bactériostatiques envers ces microorganismes. Il est alors intéressant de constater la variabilité des fonctions qu'ont adoptés les membres de cette même famille de protéines au cours de l'évolution.

Chez les mammifères, la flore commensale bactérienne est nécessaire dans de nombreux processus physiologiques du tube digestif. Il est donc important qu'elle soit tolérée et que sa présence ne déclenche pas de réaction inflammatoire. Les mécanismes de cette tolérance commencent à être compris. Il apparaît notamment que les cellules de l'épithélium expriment faiblement des PRRs de surface comme TLR2 et TLR4. Ceci permet d'éviter que les MAMPs des bactéries commensales, comme le LPS ou les lipoprotéines, ne déclenchent constamment de réponse inflammatoire (O'Hara and Shanahan, 2006; Sansonetti, 2004).

Il n'y a pas à ma connaissance, concernant la drosophile, de publication établissant l'existence d'une flore bactérienne commensale. Cependant, étant donné l'environnement microbien de cet insecte, il est très probable que le tube digestif des larves et drosophiles adultes héberge des bactéries commensales. On peut imaginer que celles-ci sont tolérées grâce à l'action des PGRP-SC1/2 qui sont précisément secrétées par les cellules épithéliales de ce tissu. En effet, présentant un niveau d'induction constitutif, PGRP-SC1 et PGRP-SC2 pourraient tout à fait, en dégradant le PGN libéré par ces bactéries, empêcher qu'il active la voie IMD. Dans un second temps, PGRP-LF pourrait également jouer son rôle de séquestration du ligand, au cas où les PGRP-SC ne dégraderaient pas tout le PGN.

De façon intéressante, un autre mécanisme de défense induit par la présence des microorganismes dans le tube digestif, nécessite d'être finement régulé. Comme chez les mammifères, les microorganismes présents dans le tube digestif de la drosophile induisent la production par les cellules épithéliales, de radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces molécules oxydent notamment les lipides membranaires et éliminent ainsi les microorganismes, mais les radicaux libres sont également toxiques envers les cellules de l'hôte, et une régulation étroite de ce mécanisme est donc nécessaire. Une balance est ainsi mise en place entre activation de ce système et la détoxification des intermédiaires réactionnels oxydants produits. Ce rôle essentiel est notamment joué par la catalase IRC dans le tube digestif de la drosophile. En l'absence de cette régulation, l'ingestion de

microorganismes tue la drosophile à cause du choc oxydatif qu'ils déclenchent (Ha et al., 2005).

Au cours de ma thèse, je me suis attaché à mieux comprendre certains des mécanismes de reconnaissance des bactéries, ainsi que les régulations que cette reconnaissance nécessite par la suite. Nos travaux ont toujours suivi la logique de la théorie PAMP/PRR énoncée il y a environ 20 ans par C. Janeway. Il se pourrait cependant que le système immunitaire des insectes soit plus complexe que l'idée que nous en avons aujourd'hui. Pour ouvrir plus largement les perspectives de mon travail, on peut évoquer deux directions que pourrait emprunter l'étude de l'immunité des insectes dans les prochaines années.

La vision actuelle de l'immunité innée des insectes est basée sur un système de reconnaissance présentant assez peu de spécificité. Cependant, la découverte récente chez la drosophile du gène *Dscam* ouvre des perspectives inattendues à ce sujet (Cherry and Silverman, 2006; Watson et al., 2005). Plus de 18 000 isoformes différentes de cette protéine membranaire qui contient 10 domaines immunoglobuline (Ig) et 6 domaines fibronectine, sont probablement produits par les hémocytes. La grande diversité, générée principalement au niveau de 3 des domaines Ig, ressemble beaucoup à ce qui est observé avec les récepteurs d'antigènes des vertébrés. Le rôle de ces protéines n'est pas établi *in vivo*, mais elles semblent être impliquées dans la phagocytose avec une probable fonction de reconnaissance et d'opsonisation des microorganismes. Il apparaît donc fort probable que la détection des microorganismes chez les insectes soit beaucoup plus complexe que l'idée que nous en avons jusqu'ici.

D'autre part, l'idée que la réponse immunitaire des invertébrés ne repose que sur un système de type inné, est peut être également trop réductrice. Un concept intéressant a en effet émergé ces dernières années, selon lequel, il existerait un troisième type de réponse, ni innée ni adaptative, non directement basée sur la reconnaissance d'un microorganisme, mais plutôt sur les conséquences du fait qu'il soit pathogène. Cette théorie appelée «Danger Model» propose que les cellules de l'hôte victimes d'un microorganisme pathogène, envoient des signaux moléculaires instruisant le système de défense de la présence du microorganisme (Matzinger, 2002). Chez les vertébrés, il a en effet été démontré que différents signaux de danger, comme l'efflux intracytoplasmique d'ions K^+ ou la présence de cristaux d'acides

uriques, sont mis en oeuvre en réponse à un stress infectieux, ou suite à la lyse de cellules infectées. D'autre part, la protéine intracellulaire NALP3 (de la famille des Nod Like Receptors) semble fonctionner comme récepteur de ses signaux de danger, en activant la caspase 1 et la production de cytokines comme IL-1 β (Meylan et al., 2006). Il serait alors intéressant de savoir si ce genre de mécanisme existe chez les insectes. Il est en effet probable que l'étude des voies de signalisation déclenchées par ce genre de signaux de danger, chez la drosophile, apporte une intéressante contribution à la compréhension de ces voies de signalisation.

Bibliographie

Bibliographie

- Agaisse, H., and Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 198, 72-82.
- 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.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 33, 255-260.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved ? *Nat Immunol* 6, 973-979.
- Avila, A., Silverman, N., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2002). The *Drosophila* atypical protein kinase C-ref(2)p complex constitutes a conserved module for signaling in the toll pathway. *Mol Cell Biol* 22, 8787-8795.
- 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.
- Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U., and Dushay, M. S. (2005). Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol* 29, 669-679.
- Boneca, I. G. (2005). The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 8, 46-53.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.
- 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.
- Brennan, C. A., and Anderson, K. V. (2004). *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol* 22, 457-483.
- Cerenius, L., and Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198, 116-126.

- Chang, C. I., Chelliah, Y., Borek, D., Mengin-Lecreulx, D., and Deisenhofer, J. (2006). Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science* *311*, 1761-1764.
- 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.
- Cherry, S., and Silverman, N. (2006). Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nat Immunol* *7*, 911-917.
- Cho, J. H., Fraser, I. P., Fukase, K., Kusumoto, S., Fujimoto, Y., Stahl, G. L., and Ezekowitz, R. A. (2005). Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood* *106*, 2551-2558.
- Choe KM, L. H., Anderson KV. (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.
- Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205-219.
- Delaney, J. R., Stöven, S., Uvell, H., Anderson, K. V., Engström, Y., and Mlodnick, M. (2006). Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF- κ B signaling pathways. *Embo J* *25*, 3068-3077.
- 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.
- Dziarski, R. (2004). Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol* *40*, 877-886.

- 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.
- 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.
- Filipe, S. R., Tomasz, A., and Ligoxygakis, P. (2005). Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the *Drosophila* Toll pathway. *EMBO Rep* 6, 327-333.
- 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.
- 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.
- Garver, L. S., Wu, J., and Wu, L. P. (2006). The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 660-665.
- Gay NJ, K. F. (1991). *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.
- 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 tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of *Drosophila* TAB2 as a functionally conserved component. *Genetics* 171, 1683-1694.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., *et al.* (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., and Sansonetti, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872.
- Glise, B., Bourbon, H., and Noselli, S. (1995). hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83, 451-461.

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.

Goto, A., Kadowaki, T., and Kitagawa, Y. (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol* 264, 582-591.

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

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

Guan, R., Roychowdhury, A., Ember, B., Kumar, S., Boons, G. J., and Mariuzza, R. A. (2004b). Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17168-17173.

Guan, R., Wang, Q., Sundberg, E. J., and Mariuzza, R. A. (2005). 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.

Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

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.

Imler, J. L., and Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy* 86, 1-21.

Ip YT, K. R., Levine M, Rushlow CA (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.

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

Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.

Janeway, C. A., Jr. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7461-7468.

- Jang, I. H., Chosa, N., Kim, S. H., Nam, H. J., Lemaitre, B., Ochiai, M., Kambris, Z., Brun, S., Hashimoto, C., Ashida, M., *et al.* (2006). A Spatzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Dev Cell* *10*, 45-55.
- 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., Brun, S., Jang, I. H., Nam, H. J., Romeo, Y., Takahashi, K., Lee, W. J., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2006). *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr Biol* *16*, 808-813.
- Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., and Miura, M. (2002). Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *J Biol Chem* *277*, 28372-28375.
- 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.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J. H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W. E., Oh, B. H., *et al.* (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol* *7*, 715-723.
- 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.
- Kaupilla, 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.
- Kawai, T., and Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* *17*, 338-344.
- 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, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W. B., Kim, J., Song, Y. H., Kim, S. N., Yoon, J. H., Kim-Ha, J., and Kim, Y. J. (2005). Downregulation of lipopolysaccharide response in *Drosophila* by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol* *6*, 211-218.
- 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.

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.

Kumar, S., Roychowdhury, A., Ember, B., Wang, Q., Guan, R., Mariuzza, R. A., and Boons, G. J. (2005). Selective recognition of synthetic lysine and meso-diaminopimelic acid-type peptidoglycan fragments by human peptidoglycan recognition proteins I α and S. *J Biol Chem* 280, 37005-37012.

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.

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.

Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42, 525-550.

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-Lecreux, 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.

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.
- Lim, J. H., Kim, M. S., Kim, H. E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K., Goldman, W. E., Silverman, N., Kurata, S., and Oh, B. H. (2006). Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J Biol Chem* *281*, 8286-8295.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2006). Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem* *281*, 5895-5907.
- 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.
- Ma, C., and Kanost, M. R. (2000). A beta1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J Biol Chem* *275*, 7505-7514.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301-305.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343-349.
- Meister, M., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (2000). The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* *248*, 17-36.
- 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.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* *442*, 39-44.
- 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.

- 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.
- O'Hara, A. M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* *7*, 688-693.
- 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. (1995). Why does *Escherichia coli* recycle its cell wall peptides? *Mol Microbiol* *17*, 421-426.
- Philpott, D. J., and Girardin, S. E. (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* *41*, 1099-1108.
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2004). In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem* *279*, 12848-12853.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* *416*, 644-648.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., and Ezekowitz, R. A. (2001). *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* *15*, 1027-1038.
- 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.
- Roitt I., B. J., Male D. (1993). *Immunology*.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Hetru, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000). The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* *12*, 569-580.
- Ryu JH, N. K., Oh CT, Nam HJ, Kim SH, Yoon JH, Seong JK, Yoo MA, Jang IH, Brey PT, Lee WJ. (2004). The homeobox gene Caudal regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* epithelia. *Mol Cell Biol* *24*, 172-185.
- Sang, Y., Ramanathan, B., Ross, C. R., and Blecha, F. (2005). Gene silencing and overexpression of porcine peptidoglycan recognition protein long isoforms: involvement in beta-defensin-1 expression. *Infect Immun* *73*, 7133-7141.
- Sansonetti, P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* *4*, 953-964.
- Scherfer C, Q. M., Takahashi K, Ueda R, Dushay MS, Theopold U, Lemaitre B. (2006). The Toll immune-regulated *Drosophila* protein Fondue is involved in hemolymph clotting and puparium formation. *Dev Biol* *295*, 156-163.

- 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.
- 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.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.
- 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.
- Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6, 9-20.
- Stronach, B. (2005). Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. *Dev Dyn* 232, 575-584.
- Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell, P. H., and Johnson, A. D. (2006). Identification of Drosophila Gene Products Required for Phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol* 4, 87-99.
- Su YC, T. J., Skolnik EY. (1998). The Drosophila Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev* 12, 2371-2380.
- 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.
- Swaminathan, C. P., Brown, P. H., Roychowdhury, A., Wang, Q., Guan, R., Silverman, N., Goldman, W. E., Boons, G. J., and Mariuzza, R. A. (2006). Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 684-689.

- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* *17*, 1-14.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 13705-13710.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S. (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *Embo J* *23*, 4690-4700.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol* *3*, 91-97.
- 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., Yuan, J., Tran, P., and Selsted, M. E. (2006). Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties. *J Immunol* *176*, 1154-1162.
- 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.
- Varfolomeev, E. E., and Ashkenazi, A. (2004). Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* *116*, 491-497.
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* *15*, 1900-1912.
- Watson, F. L., Puttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D. L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V. I., and Schmucker, D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* *309*, 1874-1878.
- Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J. L., and Gay, N. J. (2003). Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* *4*, 794-800.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13772-13777.
- 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.

Zaidman-Remy, A., Herve, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M. S., Blanot, D., Oh, B. H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2006). The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* 24, 463-473.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Zhang, R., Cho, H. Y., Kim, H. S., Ma, Y. G., Osaki, T., Kawabata, S., Soderhall, K., and Lee, B. L. (2003). Characterization and properties of a 1,3-beta-D-glucan pattern recognition protein of *Tenebrio molitor* larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation. *J Biol Chem* 278, 42072-42079.

Zhou R, S. N., Hong M, Liao DS, Chung Y, Chen ZJ, Maniatis T (2005). The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity. *J Biol Chem* 280, 34048-34055.

Zhuang, Z. H., Sun, L., Kong, L., Hu, J. H., Yu, M. C., Reinach, P., Zang, J. W., and Ge, B. X. (2006). *Drosophila* TAB2 is required for the immune activation of JNK and NF-kappaB. *Cell Signal* 18, 964-970.