

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par:
Cécile FROLET

Rôle des voies de signalisation de type $I\kappa B/NF-\kappa B$ dans la réponse immunitaire du moustique *Anopheles gambiae*

Directeur de thèse: E. Levashina

Soutenue le 1er juin 2006

Devant le jury composé de:

Elena LEVASHINA Chargée de Recherche, CNRS, IBMC, Strasbourg.....	Directeur de thèse
Jules HOFFMANN Directeur de Recherche, CNRS, IBMC, Strasbourg.....	Président
Alain ISRAEL Directeur de Recherche, CNRS, Institut Pasteur, Paris.....	Rapporteur externe
Alain TRAUTMANN Directeur de Recherche, CNRS, Institut Cochin, Paris.....	Rapporteur externe
Eric WESTHOF Professeur, ULP, IBMC, Strasbourg.....	Rapporteur interne



À une époque où règne la confusion
Où coule le sang
Où on ordonne le désordre
Où l'arbitraire prend force de loi
Où l'humanité se déshumanise
Ne dites jamais : c'est naturel
Afin que rien ne passe pour immuable
Dans la règle trouvez l'abus
Et partout où l'abus s'est montré
Trouvez le remède
Faites en sorte, quand vous quitterez ce monde
De n'avoir pas seulement été bon
Mais de quitter un monde bon.

Bertolt Brecht

librement extrait de *Sainte Jeanne des abattoirs*

Je tiens à remercier ici tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à faire de ce travail ce qu'il est.

En préambule, je remercie tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont fait découvrir le virus de la recherche et en particulier le monde merveilleux de l'immunologie : Christian Bonnerot, Luc Teyton, Alain Trautmann. Même si ça peut paraître un peu bizarre j'ai toujours eu le sentiment d'avoir beaucoup de chance de vivre dans un pays tel que la France et je tiens à souligner ici que les opportunités qui m'ont été offertes par mon pays ont joué un rôle crucial dans mon parcours.

Tout d'abord, je voudrais remercier Alain Israël, Alain Trautmann et Eric Westhof qui ont accepté de juger cette thèse pour les remarques intéressantes et constructives qu'ils ont formulées à cette occasion.

Je tiens à remercier Jules Hoffmann pour sa forte implication tout au long de ce travail. J'ai beaucoup apprécié votre disponibilité dans les moments difficiles, et les nombreuses discussions de tous ordres que nous avons pu avoir.

Lena, je te remercie pour la liberté puis la confiance que tu m'as laissées dans l'organisation du travail. Je sais que travailler avec moi n'a pas été de tout repos, mais je suis heureuse qu'au bout de quelques années nous ayons réussi le défi ! Merci pour toutes les fois où tu as donné de ton temps pour m'aider concrètement quand ça coïncitait, pour les réponses à mes innombrables questions, et pour ta forte implication scientifique dans mon travail. Merci aussi d'avoir respecté ma vie un peu speed et mon caractère de révoltée. Merci enfin pour toutes les opportunités de voyager et d'apprendre que tu donnes à tous, et pour l'atmosphère internationale et conviviale que tu as su créer au laboratoire.

J'ai beaucoup apprécié de pouvoir interagir avec de nombreux membres du laboratoire au cours de ce travail. Je remercie en particulier Jean Luc Imler pour les discussions autour du projet MyD88 et pour l'attention particulière qu'il m'a toujours portée. Je remercie aussi Dominique Ferrandon, source intarissable de connaissances qui m'a souvent épargné beaucoup de travail inutile. Merci aussi à Charles Hetru, Julien Royet et Jean Marc Reichhart pour les discussions que nous avons eues sur le boulot et le reste.

Cette histoire a commencé avec la création d'un laboratoire, de zéro, ce qui n'était pas de tout repos. Je remercie du fond du cœur Nicolas Baldeck avec qui cette histoire a commencé. Tu as beaucoup compté pour moi dans les moments difficiles qu'on a eus. Je te souhaite bonne chance pour la suite. Je pense aussi à David Rabel qui a passé du temps à résoudre les divers problèmes techniques.

Je tiens à souligner l'importance de tous ceux qu'on ne cite jamais. L'élevage des moustiques nécessite un travail rigoureux, soigneux et beaucoup d'organisation et je tiens donc à remercier tous les techniciens qui ont participé à la maintenance de cet élevage au cours de ces années, en particulier Fatima, Yousra, Noémie, Laurence et Julien. Le travail des animaliers a aussi été un travail de l'ombre mais tellement important ! Merci à Bruno et Grégory. Je n'oublie pas tous ceux qui ont à un moment ou à un autre eu la responsabilité des souris : Shin Hong, Marie Eve et Christine. Le travail de maintenance du labo a permis que les journées soient plus légères, merci Laurence pour ta franchise, ta rigueur et ta conscience professionnelle, merci Marie Ève, ton aide a été très précieuse.

Je tiens à remercier aussi ceux qui ont de près ou de loin pris part à ce travail : Christine Kappler en particulier quand j'avais le poignet cassé, Jean-Hervé Lignot pour la microscopie à balayage, Christelle Thibault pour les puces à ADN, Daniel Zachary pour mes tatonnements sur les hémocytes, et Martine Thoma qui a rejoint le projet il y a un an et demi. Je remercie aussi tous les membres du labo OCEAC-IRD à Yaoundé, pour leur disponibilité, leur accueil formidable et le travail que nous avons pu réaliser ensemble : Isabelle Morlais, Parfait Awono-Ambene, Rose, Sylvie, Isaac, Serge, Sandrine, Constance, Emmanuel, et aussi Christelle pour ta joie de vivre et les supers moments vécus ensemble au Cameroun.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe moustique avec qui j'ai beaucoup apprécié de travailler, partager, échanger. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire et en particulier Catherine, Cécile et Jean-Michel avec qui on a partagé ces 4 ans. Les amis vous m'avez manqué ces derniers mois !

Au cours de cette thèse j'ai eu la chance de participer concrètement à la réflexion sur le doctorat au niveau national avec la CJC, et localement avec l'Addal. J'y ai appris beaucoup et comme j'ai eu le bonheur de réaliser cette thèse à une époque agitée pour la recherche, j'ai rencontré beaucoup de gens qui voulaient changer les choses, ça c'est inoubliable !

Enfin, ma reconnaissance va à tous ceux qui ont partagé ma vie mouvementée pendant ces années. J'ai souvent été en retard et vous ne m'en avez jamais voulu ! Catherine pour nos soirées de filles, Stéphanie et Fred pour vos petits plats, Jean Pascal pour ton attention, tous ceux qui étaient loin... Et puis bien sûr ma famille chérie, Julie, mamie Anne, Hugues, Agnès, Lucie, Bénédicte, mes chers parents, Sébastien.

Sommaire

Introduction p9

- i.1. Les insectes vecteurs p9
 - i.1.1. Pathogènes associés aux insectes vecteurs p9
 - i.1.2. Le coût économique, humain et social des pathologies provoquées par les insectes vecteurs p12
- i.2. La drosophile, paradigme de l'immunité des insectes p14
 - i.2.1. Mécanismes de défense p14
 - i.2.2. La réponse aux infections bactériennes et fongiques p16
 - i.2.3. Les autres pathogènes ? p20
- i.3. L'anophèle, modèle des interactions hôte-parasite chez les insectes p22
 - i.3.1. *Anopheles gambiae* p22
 - i.3.2. Le plasmodium p23
 - i.3.3. Les interactions anophèle-plasmodium, quelques concepts des interactions hôte-pathogène p26
 - i.3.4. Y a t'il chez le moustique une réponse immunitaire contre le plasmodium ? p28

Chapitre I - Analyse fonctionnelle comparative de MyD88 chez l'anophèle et chez la drosophile p33

- I.1. Matériel et méthodes p39
 - I.1.1. Analyse bioinformatique p39
 - I.1.2. Lignées de drosophiles p39
 - I.1.3. Infections p41
 - I.1.4. Northern blotting p42
 - I.1.5. Préparation de cuticules d'embryons p42
- I.2. Résultats p45
 - I.2.1. Comparaison bioinformatique des protéines MyD88 d'anophèle et de drosophile p45
 - I.2.2. Signalisation par la voie Toll p48
 - I.2.3. Survie après une infection p51
 - I.2.4. Sauvetage du phénotype de stérilité des mouches *DmMyD88^{-/-}* p52
- I.3. Conclusions-discussion p55

Chapitre II - A la recherche de la voie Toll chez l'anophèle p59

- II.1. Matériel et méthodes p63
 - II.1.1. Analyse bioinformatique p63
 - II.1.2. Infections p63
 - II.1.3. Invalidation des gènes par ARN interférence p63
 - II.1.4. Northern blotting p64
 - II.1.5. Microscopie à balayage p65

II.2. Résultats p67

II.2.1. Mise au point des conditions d'infection et expériences de survie p67

II.2.2. Régulation de l'expression des peptides antimicrobiens d'*A. gambiae* après différents types d'infections p71

II.2.3. Analyse bioinformatique p75

II.2.4. Les composants de la voie Toll sont-ils impliqués dans la production des peptides antimicrobiens et la résistance aux infections? p79

II.3. Conclusions-discussion p83

Chapitre III – Rôle de la famille NF- κ B dans l'immunité contre *P. berghei* p89

III.1. Modifier l'immunité basale des anophèles influe sur leur sensibilité vis à vis de *P. berghei* p91

III.2. Données complémentaires p111

III.3. Discussion p114

Chapitre IV - Perspectives offertes par l'invalidation de *Cactus* pour les recherches sur les interactions entre anophèle et plasmodium p115

IV.1. Matériel et méthodes p117

IV.1.1. Réalisation des puces à ADN p117

IV.1.2. Infection par *P. falciparum* p117

IV.2. Résultats p119

IV.2.1. A la recherche des cibles du module *Cactus/Rel1* p119

IV.2.2. Spécificité du phénotype d'invalidation de *Cactus* p123

IV.3. Discussion p127

Perspectives p131

Bibliographie p139

Annexe p149

Introduction

i.1. Les insectes vecteurs

i.1.1. Pathogènes associés aux insectes vecteurs

Les insectes représentent plus de 60% de l'ensemble des espèces animales décrites et beaucoup d'entre eux restent sans doute encore inconnus. La classe des insectes a réussi à coloniser la quasi totalité des milieux naturels, et à s'adapter à de nombreux modes de vie, constituant ainsi l'une des plus grandes réussites du règne animal (Rodhain et Perez, 1985).

Les insectes ont pour caractéristique essentielle de posséder un exosquelette constitué par une cuticule rigide qui s'assouplit au niveau des articulations. Cette cuticule rigide est à l'origine de la croissance discontinue des insectes qui se fait par mues successives lors des stades larvaires. Le corps des insectes adultes est divisé en trois parties, la tête, le thorax et l'abdomen et comporte classiquement six pattes et quatre ailes.

Un certain nombre d'insectes sont hématophages, et interagissent donc de manière régulière avec des vertébrés. Ces interactions les ont conduits à devenir au fil de l'évolution des vecteurs de pathogènes dont le cycle se partage entre ces vertébrés et les insectes. Les insectes sont parfois de simples véhicules pour les pathogènes, mais ils peuvent aussi être des hôtes intermédiaires voire obligatoires pour les pathogènes qui, dans ce dernier cas, réalisent une partie essentielle de leur cycle vital chez l'insecte.

Dès l'antiquité on a imaginé que des insectes tels que les moustiques pouvaient être vecteurs de maladies comme le paludisme. La première observation formelle d'un parasite humain chez un insecte date de 1877 en Chine où Sir Patrick Manson a pu observer le développement de la filaire chez le moustique. Plus tard on a découvert d'autres interactions entre des parasites et des insectes. Citons en particulier la découverte en 1897 par Ross d'oocystes de plasmodium dans les intestins d'anophèle, puis en 1899 la preuve définitive de la transmission du paludisme humain par les anophèles faite par Grassi et ses collègues. Depuis, beaucoup d'informations ont été obtenues sur les interactions entre des pathogènes de l'homme et des insectes. Parmi les agents pathogènes véhiculés par les insectes, il y a des virus, des bactéries, des protozoaires, des filaires... (Rodhain et Perez, 1985)

i.1.1.1. Les arbovirus

Les virus transmis par les insectes font partie de la famille des arbovirus (arthropode borne virus). Il existe plus de 500 espèces d'arbovirus, réparties sur presque toute la surface du globe. L'homme n'est en général pas le réservoir des arbovirus, souvent constitué par un autre vertébré. La transmission à l'homme n'est donc la plupart du temps pas nécessaire pour le maintien du virus, elle intervient fortuitement lorsque le vecteur pique un homme lors de son repas sanguin. La plupart des arboviroses passent inaperçues. Les arboviroses donnant des symptômes sévères chez les hommes sont majoritairement véhiculées par des moustiques. On peut noter toutefois en Alsace le cas de l'encéphalite à tique d'Europe centrale, transmise comme son nom l'indique par les tiques. Le virus responsable de cette encéphalite est un flavivirus, le TBEV (Tick Borne Encephalitis Virus), dont le réservoir est constitué par les rongeurs (mulots, campagnols). On recense moins de 10 cas par an en Alsace, qui sont rarement mortels.

Parmi les arbovirus connus pour leur dangerosité, on peut noter le virus de la fièvre jaune et le virus de la Dengue.

Le virus de la fièvre jaune ou virus amaril est un flavivirus, dont le réservoir est constitué par les singes et qui est transmis par les moustiques *Aedes*. La maladie a été décrite dès le XII^e siècle au Yucatan et le virus responsable de cette fièvre hémorragique a été isolé en 1927. On recense 200000 cas et 30000 décès par an, la majorité en Afrique, ce qui est très largement sous-estimé du fait de la sous notification des cas (source, OMS). Un vaccin existe et protège pour 10 ans au moins.

Le virus de la Dengue est un flavivirus dont l'homme est le réservoir, et qui est transmis par les moustiques *Aedes*. En fait, 4 virus différents (DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4) provoquent la maladie et l'infection par un des virus ne protège pas des autres. Le virus donne des symptômes de type grippaux, mais peut se compliquer en fièvre hémorragique, qui elle peut être mortelle. Chaque année le virus provoque 50 millions de cas dont 500000 nécessitent une hospitalisation et au moins 15000 sont mortels, souvent faute de soins (source, OMS).

On peut signaler enfin le virus du Chikungunya qui a attiré l'attention ces derniers mois à cause d'une épidémie majeure sur l'île de la Réunion. Plus d'un an après le début de l'épidémie en mars 2005, on estimait le nombre de cas sur l'île à 236000. Le virus a été incriminé comme facteur aggravant dans un certain nombre de décès mais ne semble pas mortel. Les singes constituent le réservoir de cet alphavirus qui est véhiculé d'un primate à l'autre par des moustiques du genre *Aedes*.

i.1.1.2. Les bactéries

Les bactéries sont souvent transportées de manière mécanique d'un vertébré à l'autre par la piqûre d'un insecte hématophage, mais il existe des

cas où l'insecte joue le rôle de vecteur, comme par exemple celui de la peste bubonique. L'agent responsable de la peste est le bacille *Yersinia pestis*, dont le réservoir est constitué en ville par les rats et qui est transmis d'un vertébré à l'autre par piqûre d'une puce. De nos jours la peste tue encore, mais il s'agit surtout de la forme pulmonaire, transmise directement d'homme infecté à homme sain.

i.1.1.3. Les protozoaires

Les protozoaires sont responsables des plus grandes endémies actuelles, et un certain nombre d'entre eux sont transmis par des insectes vecteurs.

Les trypanosomes africains agents de la trypanosomose humaine africaine (ou maladie du sommeil) sont transmis par les glossines (ou mouches tsé-tsé). Cette maladie tropicale est retrouvée uniquement en Afrique Sub-saharienne. Son expansion est favorisée par des facteurs socio-économiques tels que guerres, pauvreté... La glossine est le vecteur et le réservoir majeur est constitué par l'homme même si le porc domestique peut également être hôte accidentel. Les trypanosomoses animales, touchant de nombreux élevages bovins en Afrique Sub-saharienne accentuent aussi la précarité de la situation des personnes vivant dans les zones touchées. L'OMS estime que de 300 à 500 millions de personnes sont touchées, et dans certaines provinces d'Angola et du Congo, c'est la deuxième cause de mortalité après le SIDA.

Les plasmodiums responsables du paludisme humain sont transmis aux hommes par une piqûre du moustique vecteur anophèle. L'OMS estime qu'ils sont responsables chaque année de plus de 300 millions de cas et 1 million de décès, principalement parmi les enfants de moins de 5 ans. Deux milliards de personnes sont exposées au risque. L'homme est le réservoir du parasite, et l'espèce mortelle *Plasmodium falciparum* est retrouvée principalement en Afrique Sub-saharienne. Les hommes qui réchappent à la forme cérébrale de la maladie développent une immunité qui les protège des formes cérébrales mortelles. Dans les zones d'endémie, le nombre de piqûres infectieuses peut atteindre une à plusieurs par jour, ce qui fait que les sujets sont constamment réinfectés puis infectants pour les moustiques (Mouchet *et al.*, 2004). Trois autres espèces de plasmodium peuvent donner le paludisme, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*, mais leur évolution n'ira jamais jusqu'à la forme cérébrale. Certains d'entre eux (*P. vivax* et *P. ovale*) peuvent rester dormants dans le foie provoquant des rechutes longtemps après une piqûre infectieuse, alors que *P. falciparum* est éliminé par le système immunitaire et ne réapparaît plus une fois que le sujet est guéri et en l'absence de nouvelle piqûre. Le paludisme est aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

i.1.1.4. Les filaires

Les filaires sont des vers transmis par les moustiques lors d'un repas sanguin et qui se localisent dans le système lymphatique de l'homme. Elles

provoquent une maladie appelée filariose lymphatique ou elephantiasis à cause des hypertrophies de membres (jambes, bras, organes génitaux...) qu'elles provoquent. L'homme est souvent le réservoir de ces parasites et le moustique est un vecteur. On estime que plus de 120 millions d'humains sont actuellement infectés dont 40 millions gravement handicapés et un milliard de personnes sont exposées au risque en Afrique, Inde, Asie du sud, Pacifique, Amériques (source, OMS). Cette maladie est surtout une maladie de la pauvreté, et la visibilité des symptômes est source de lourds handicaps sociaux pour les malades.

i.1.2. Le coût économique, humain et social des pathologies provoquées par les insectes vecteurs

On estime que chaque année dans le monde, 1/3 des décès (16 millions) sont causés par les maladies infectieuses. Parmi celles-ci, le SIDA avec plus de 3 millions de morts par an, est le plus meurtrier (source, Institut Pasteur). La maladie infectieuse la plus répandue est le paludisme avec 500 millions de cas par an, et 2 milliards d'humains exposés au risque. Le paludisme tue essentiellement des enfants de moins de 5 ans avec presque 1 million de décès chaque année (source OMS). Les maladies infectieuses sont responsables de 43% des décès dans les pays en développement, contre 1% dans les pays industrialisés (source, Institut Pasteur). Comme détaillé plus haut, ces pathologies sont souvent associées à la pauvreté, augmentant encore les inégalités entre pays touchés par ces pathologies (souvent des pays en développement) et pays industrialisés. Ces pathologies peuvent aussi aggraver la pauvreté, avec par exemple des dégâts considérables causés aux exploitations agricoles par les trypanosomoses animales. Souvent, l'instabilité politique, les guerres, les déplacements de populations accentuent encore la progression des pathologies et les défauts de prévention, de dépistage et d'administration des traitements lorsqu'ils existent.

Le paludisme est donc la pathologie la plus grave qui soit transmise par des insectes. Comme la plupart des maladies vectorielles, il touche principalement les pays en développement, avec la majorité des cas en Afrique Sub-saharienne. En effet, les pays industrialisés ont su par des méthodes souvent drastiques (la suppression des insectes vecteurs) éliminer de leur territoire un certain nombre d'affections, notamment le paludisme en Europe, évincé grâce à l'utilisation massive de l'insecticide DDT et à l'assèchement des marais.

Les conséquences du paludisme sont multiples, en particulier au niveau socio-économique. L'OMS estime que le paludisme est responsable de 40% des dépenses de santé publique et de 30 à 50% des admissions dans les hôpitaux dans les zones de forte transmission. Les pertes de croissance dues au paludisme sont estimées à 18% des revenus pour 1995 dans les zones d'Afrique les plus touchées (Sachs et Malaney, 2002). Ces pertes économiques

s'accompagnent de coûts pour les populations, pour se soigner, acheter des moustiquaires imprégnées d'insecticide, accompagner un proche malade... Le paludisme est responsable de journées de travail manquées, mais aussi d'un absentéisme élevé à l'école primaire dans les zones d'endémie (Brooker *et al.*, 2000). L'éducation des enfants souffre donc de la forte prévalence de la malaria, qui provoque aussi des séquelles neurologiques pour les enfants qui réchappent des formes cérébrales, et des séquelles de développement pour les enfants dont la mère a fait un épisode paludique pendant sa grossesse. Ces phénomènes sont accentués par la fertilité importante dans les régions de forte endémie. Cette fertilité accrue s'explique par la forte mortalité infantile qui pousse les familles à donner la vie à plus d'enfants pour assurer leur survie future. Ceci diminue donc d'autant les moyens dévolus à l'éducation de chaque enfant (Sachs et Malaney, 2002). Ainsi au plan humain, le bilan est catastrophique. Dans les zones de forte endémie, la mortalité infantile due au paludisme est toujours très élevée, faute de moyens financiers pour protéger (moustiquaires imprégnées d'insecticide) et soigner les enfants. Cette mortalité se double de conséquences à plus long terme sur l'éducation des enfants.

Alors qu'on imaginait dans les années 1950 que de même que le paludisme avait été évincé d'Europe, il serait facile de le supprimer de la planète, on se rend compte aujourd'hui que les problèmes de multirésistances des moustiques aux insecticides (apparues en moins de 5 ans pour le DDT (Mouchet *et al.*, 2004)), de résistance du parasite aux traitements, et de pauvreté n'ont fait qu'aggraver la situation dans les pays en développement qui souffrent de plus d'une forte corruption qui empêche le bon emploi de l'aide internationale (coordonnée par exemple via le programme Roll Back Malaria de l'OMS) (Philippe Bernard, *Le Monde, En Afrique, la lutte contre le paludisme pâtit d'incohérences*, 22 novembre 2005).

Il devient donc urgent de développer de nouveaux moyens de lutte contre le paludisme. La suppression complète du vecteur apparaît comme un but illusoire dans des régions où toute l'année la température permet leur développement correct. La forte plasticité du génome de l'anophèle vecteur comme du parasite *Plasmodium* rend la mise au point de solutions pérennes extrêmement difficile. On assiste à une course entre la mise au point de nouveaux insecticides et de nouveaux traitements antipaludéens et les résistances acquises et transmises rapidement dans les populations d'anophèles et de plasmodiums. La question d'un vaccin contre le paludisme est posée, mais là encore la flexibilité du génome du parasite se révèle un obstacle compliqué à dépasser. A l'heure où ce travail a débuté, la majorité de l'énergie de la recherche contre le paludisme était investie dans la compréhension des épisodes humains du cycle du plasmodium. La question du vecteur avait été principalement abordée du point de vue de sa suppression pure et simple. Nous avons voulu, grâce aux connaissances acquises sur les insectes et en particulier la drosophile, poser la question des interactions moléculaires et cellulaires entre le moustique vecteur et le plasmodium. Par ailleurs, comme nous l'avons signalé dans la première partie, les moustiques sont vecteurs

de nombreuses maladies infectieuses, et une meilleure connaissance de leur système immunitaire pourrait offrir de nouvelles voies de lutte contre ces endémies.

i.2. La drosophile, paradigme de l'immunité des insectes

Drosophila melanogaster, la mouche du vinaigre est utilisée depuis la fin du XIX^e siècle dans les laboratoires comme insecte modèle. La drosophile est un diptère, c'est à dire un insecte possédant deux ailes (les deux autres sont atrophiées en balanciers). La rapidité de son cycle de reproduction ainsi que sa facilité d'élevage ont permis des avancées considérables en particulier en génétique. On peut citer notamment la preuve rigoureuse de la théorie chromosomique de l'hérédité apportée en 1910 par Morgan. Par la suite les travaux sur la drosophile ont permis de démontrer l'arrangement linéaire des gènes sur les chromosomes et donc de constituer les premières cartes physiques du génome. La drosophile a donc tout naturellement été choisie pour étudier la génétique de la réponse immunitaire des insectes, après la découverte chez le papillon *Hyalophora cecropia* de peptides à capacité antimicrobienne, par Hans Boman en 1980 (revu dans Boman et Hultmark, 1987), découverte qui permet de lancer l'hypothèse d'une réponse immunitaire des insectes. Les données présentées ici sont le résultat des travaux menés sur le système immunitaire du modèle drosophile depuis le milieu des années 80.

i.2.1. Mécanismes de défense

i.2.1.1. Mécaniques

Comme nous l'avons vu au début de cette introduction, les insectes ont pour particularité d'être protégés par un exosquelette rigide, la cuticule, qui les protège efficacement contre toute entrée de pathogène en fonctionnant comme une barrière mécanique. Pour pénétrer dans l'hémocoèle, les microorganismes doivent donc soit percer cette cuticule (c'est le cas de nombreux champignons), soit pénétrer par les trachées qui sont des invaginations de la cuticule permettant l'arrivée d'air aux tissus, soit être ingérés.

i.2.1.2. Les peptides antimicrobiens

Une fois que les pathogènes ont traversé la cuticule, par une blessure ou de manière active, ils pénètrent l'hémocoèle où ils sont directement en

contact avec l'hémolymphe. Dans l'hémolymphe circulent un certain nombre de molécules dont les peptides antimicrobiens. L'idée de l'existence de telles molécules est assez ancienne (dès les années 1920), car il avait été observé par exemple que les infections bactériennes induisent chez les insectes une immunité humorale puissante, capable d'agir directement pour supprimer les bactéries. La preuve formelle de l'existence des peptides antimicrobiens a été apportée par la caractérisation du premier d'entre eux, la cécropine, purifiée du papillon *Hyalophora cecropia* par Hans Boman en 1981 (revu dans Boman et Hultmark, 1987). Ces peptides sont de petites protéines réparties en différentes familles ayant chacune des propriétés particulières. Les cécropines sont formées d'hélices amphipatiques capables de se lier à la surface des bactéries et de former des pores. La drosophile possède des peptides antimicrobiens appartenant à 7 familles distinctes : Drosomycines, Diptéricines, Attacines, Cécropines, Drosocine, Metchnikowine, Défensine. Elles ont un spectre d'action antimicrobien qui diffère et des modes d'actions variés (revu dans Hoffmann, 1995; Hoffmann et Reichhart, 2002).

i.2.1.3. Organes, tissus et cellules impliqués

Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire chez la drosophile sont les hémocytes. Leur existence est connue depuis la fin du XIXe siècle et ils ont été les premiers éléments du système de défense des insectes étudiés. Malgré tout, on connaît aujourd'hui encore assez peu de choses sur leur place dans le système immunitaire de la drosophile. Les hémocytes des insectes sont circulants dans l'hémolymphe ou accrochés à différents tissus. Il en existe trois types chez la drosophile, produits majoritairement lors des stades larvaires et conservés chez l'adulte pour certains d'entre eux (revu dans Meister et Lagueux, 2003). Les plasmatoctes sont les hémocytes les plus nombreux chez les larves (95%) et les seuls hémocytes des adultes (il n'y a vraisemblablement pas d'hématopoïèse chez les adultes, les plasmatoctes des adultes dérivent des plasmatoctes larvaires soit directement soit par mitose). Ils sont spécialisés dans la phagocytose des bactéries et il a été démontré que leur saturation par l'injection de billes de latex rend les drosophiles au système immunitaire déficient plus sensibles à une infection (Elrod-Erickson *et al.*, 2000). Les plasmatoctes peuvent, chez la larve, suite à la présence d'un corps étranger trop grand pour être phagocyté se différencier en lamellocytes qui sont de grandes cellules aplaties capables d'entourer le corps étranger et ainsi de l'isoler, c'est le phénomène d'encapsulation (revu dans Meister et Lagueux, 2003)). Enfin, les cellules à cristaux contiennent les enzymes nécessaires pour les réactions de mélanisation. La mélanisation est un processus spécifique des invertébrés qui permet de recouvrir de mélanine les œufs, les larves, les pupes afin de solidifier l'exosquelette. C'est un processus biochimique qui permet de convertir des tyrosines en mélanine suite à une cascade protéolytique impliquant des sérines protéases (revu dans Cerenius et Soderhall, 2004)). Cette cascade protéolytique permet d'activer une des enzymes clé du système, la phénoloxydase. Le rôle de la mélanisation dans

l'immunité est encore controversé, en effet elle est parfois considérée comme un processus secondaire (arrivant dans un deuxième temps pour isoler définitivement le lieu d'une blessure ou un corps étranger déjà encapsulé). Il a été démontré récemment que l'activité de la phénoloxydase n'est pas nécessaire chez la drosophile pour la résistance aux infections (Leclerc *et al.*, 2006).

L'organe immunitaire de la drosophile est le corps gras, réparti sur la face interne de l'abdomen. Cet organe est capable de produire massivement les peptides antimicrobiens (revu dans Hoffmann et Reichhart, 2002).

i.2.2. La réponse aux infections bactériennes et fongiques

i.2.2.1. Les voies de type NF- κ B et le contrôle de l'expression des peptides antimicrobiens

Rapidement après la découverte des peptides antimicrobiens de la drosophile, on a constaté la présence de sites de type NF- κ B dans leurs promoteurs et leur importance dans le contrôle de la transcription de certains peptides antimicrobiens (Engstrom *et al.*, 1993, Kappler *et al.*, 1993). Les peptides antimicrobiens sont induits après une infection chez la drosophile et il a été proposé dès 1995 que cette induction était dépendante de deux voies de signalisation distinctes qui contrôleraient la réponse immunitaire de la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1995). L'objet de cette partie est de résumer les éléments fondamentaux connus sur ces deux voies, Toll et Imd, les articles cités seront essentiellement des revues, qui contiennent les références originales.

i.2.2.1.1. La voie Toll

La voie Toll était connue pour son rôle dans le développement embryonnaire chez la drosophile avant d'être étudiée pour son rôle dans l'immunité (revu dans Moussian et Roth, 2005). En 1996, Lemaitre *et al.* ont démontré son implication dans la réponse immunitaire des drosophiles contre les champignons (Lemaitre *et al.*, 1996). Par la suite, il a été démontré que la voie Toll est impliquée dans la réponse aux bactéries à Gram positif également (revu dans Hoffmann et Reichhart, 2002; Hoffmann, 2003). Les progrès récents sur la connaissance de cette voie concernent essentiellement les éléments extracellulaires de la cascade impliqués dans la reconnaissance des pathogènes (Royet *et al.*, 2005). Le récepteur Toll (qui a donné son nom à la voie) est activé par le clivage puis la liaison d'une cytokine, spaetzle, suite à une cascade protéolytique (figure i.1). Les éléments de cette cascade protéolytique sont encore largement inconnus et d'ailleurs, elle n'est vraisemblablement pas unique, puisque les bactéries à Gram positif et les champignons activent au moins deux cascades

distinctes. Un certain nombre de bactéries à Gram positif sont reconnues par un complexe de deux récepteurs circulants, appelés GGBP-1 (Gram Negative Bacteria-binding Protein 1) et PGRP-SA (Peptidoglycan Recognition Protein Short A), capables de lier respectivement le β 1,3 glucane et le peptidoglycane, qui sont des éléments des parois bactériennes ou de champignons. Une protéase de la cascade activée par les champignons est connue, perséphone (PSH). Le récepteur Toll une fois activé peut signaler via son domaine TIR (Toll/IL1 Receptor) à la protéine MyD88, elle même liée à Tube et Pelle, une kinase. Ces éléments aboutissent à la phosphorylation de la protéine Cactus

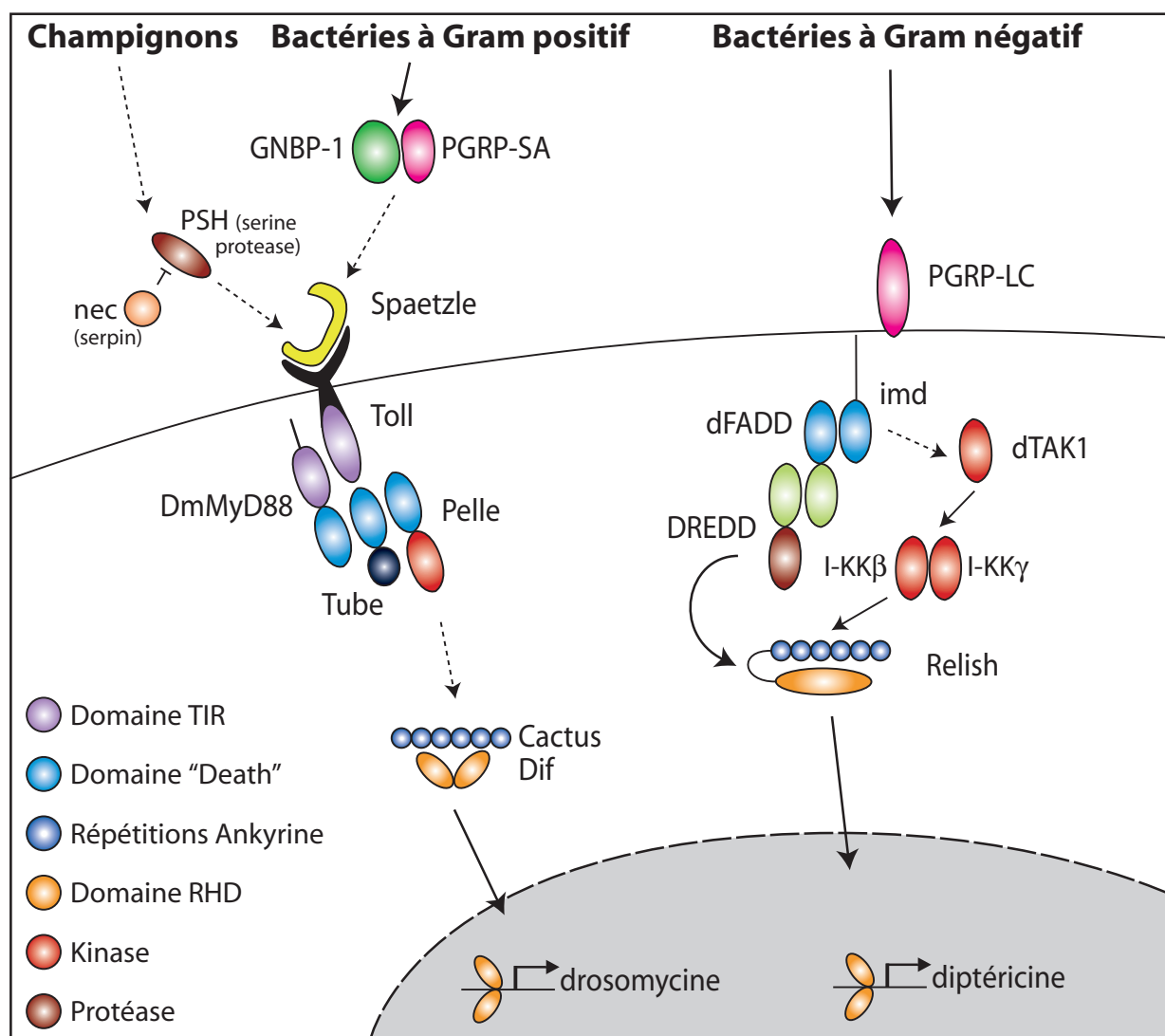


Figure i.1. Les voies Toll et Imd de la drosophile. La voie Toll, du nom du récepteur Toll est activée suite à une infection par un champignon ou une bactérie à Gram positif. L'activation de la voie se fait via différentes cascades. On sait que certaines bactéries à Gram positif sont reconnues directement par des protéines se fixant aux motifs de pathogènes comme les PGRP ou les GGBP. Les champignons activent une cascade de protéases. Ces évènements aboutissent au clivage de Spaetzle qui permet l'activation du récepteur Toll aboutissant ultimement à la translocation de Dif dans le noyau et à la transcription d'un ensemble de gènes dont la *Drosomycine* utilisée comme rapporteur de la voie. La voie Imd, du nom du premier composant caractérisé de la voie est activée directement via son récepteur PGRP-LC par les motifs de pathogènes. D'autres molécules interviennent mais toutes ne sont pas connues. Deux branches de la voie permettent de cliver Relish puis de dégrader son domaine ankyrine, permettant ainsi la translocation nucléaire du facteur de transcription Relish et la transcription d'un ensemble de gènes dont la *Diptéricine* utilisée comme rapporteur de la voie.

par une kinase qui reste inconnue et qui n'est pas Pelle, ce qui conduit à sa dégradation. Cactus est un inhibiteur de type $I\kappa B$, capable d'interagir avec les protéines de type NF- κB , principalement Dif chez la drosophile dans le cas de l'immunité. Lorsque Cactus est dégradé, Dif est transporté dans le noyau et la transcription des gènes cibles de la cascade Toll dont le gène codant pour le peptide rapporteur Drosomycine est activée.

La découverte du rôle de Toll dans la réponse immunitaire de la drosophile a conduit à la découverte des Toll Like Receptors (TLR) chez les mammifères (Medzhitov *et al.*, 1997), ouvrant tout un champ d'étude dans l'immunité. A la différence du récepteur Toll de la drosophile, les TLR des mammifères reconnaissent directement des motifs de pathogènes et permettent l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

i.2.2.1.2. La voie Imd

La particularité de la voie Imd est d'être activée par les pathogènes, grâce à son récepteur de type PGRP, PGRP-LC (figure i.1). Pour l'instant c'est le seul récepteur de la voie identifié, mais il n'est pas exclu qu'il y en ait d'autres. La voie Imd répond spécifiquement en cas d'infection par des bactéries à Gram négatif (revu dans Royet *et al.*, 2005). Elle a été nommée du nom du premier composant intracellulaire de la voie connu, Imd, qui est une protéine à domaine « Death ». Imd interagit avec dFADD qui active ensuite DREDD, une protéase, qui clive le facteur NF- κB Relish et le libère de sa partie inhibitrice $I\kappa B$. Ce clivage intervient après la phosphorylation des domaines ankyrine de la partie $I\kappa B$ de Relish, par le complexe IKK β /IKK γ . Relish peut activer la transcription d'un certain nombre de gènes, dont celle du gène codant pour le peptide rapporteur Diptéricine.

i.2.2.2. NF- κB dans la réponse immunitaire au cours de l'évolution

Les drosophiles mutantes pour les deux voies de signalisation Toll et Imd sont extrêmement fragiles et incapables de se défendre normalement contre une infection quelle qu'elle soit (De Gregorio *et al.*, 2002; Lemaitre *et al.*, 1996). Leur survie en l'absence de toute infection expérimentale, dans les conditions normales d'élevage est extrêmement affaiblie. On peut donc dire que les protéines de type NF- κB sont responsables pour une grande part du maintien de l'immunité des drosophiles. La question de cette forte immunité des insectes avait poussé Pierre Joly à conduire les premières études sur leur système immunitaire dans les années 1960. Partant de l'observation que dans des conditions d'élevage largement non stériles, de transplantations d'organes sans précautions particulières, les insectes survivent extrêmement bien, Pierre Joly avait imaginé qu'ils possédaient sans doute un système immunitaire très efficace. Les études conduites jusqu'ici ont donc largement confirmé cette hypothèse, démontré le rôle fondamental des protéines NF- κB dans ces

mécanismes et ouvert des pans jusque là peu explorés des mécanismes de réponse immunitaire : peptides antimicrobiens, reconnaissance directe des motifs de pathogènes...

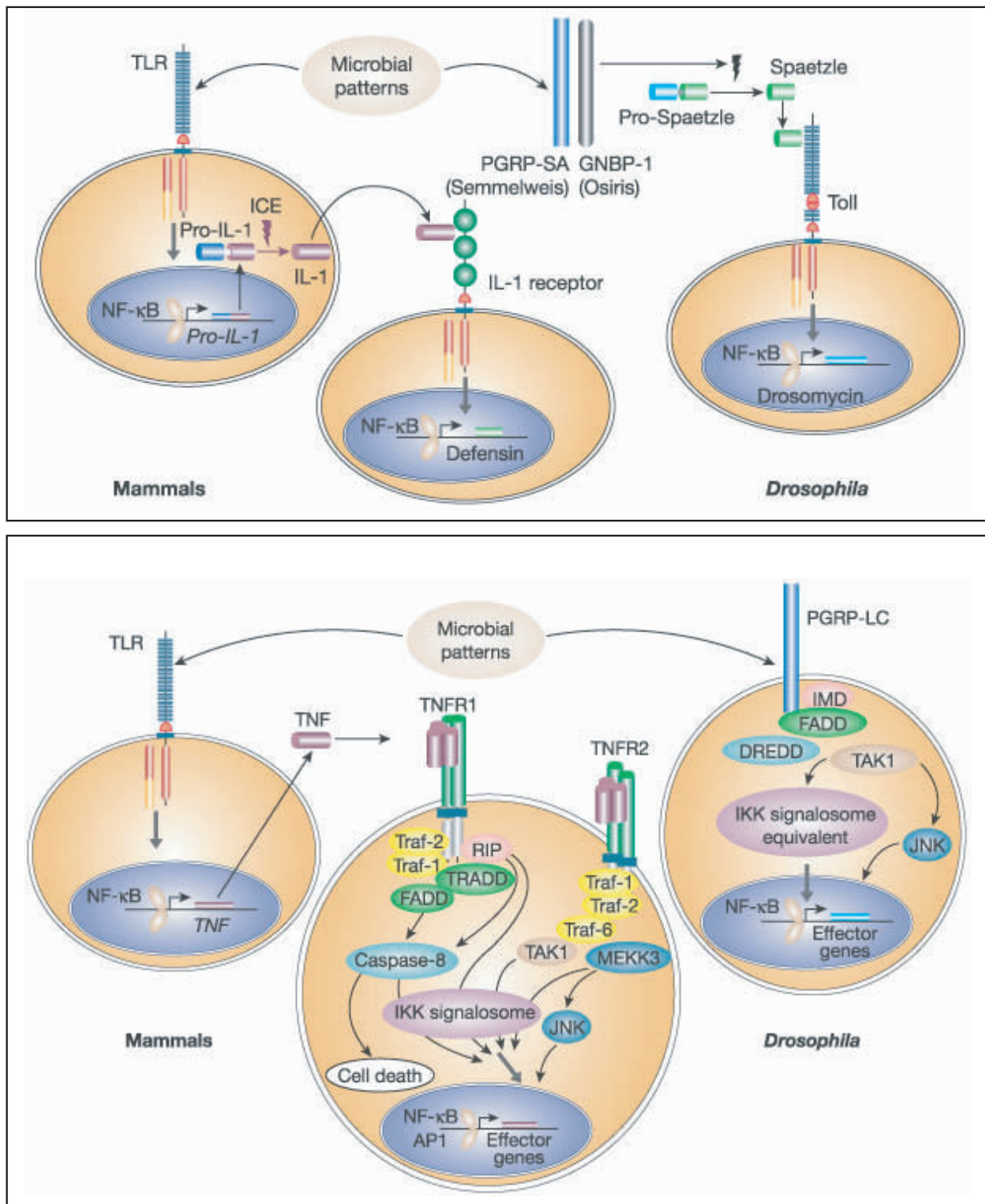


Figure i.2. Parallèles entre les voies NF-κB des mammifères et de la drosophile (d'après Hoffmann, 2003). Dans les deux cas, les protéines de type NF-κB sont des éléments centraux de la régulation des réponses immunitaires. Les voies de signalisation utilisées sont conservées. La voie Toll est apparentée aux voies de l'IL1 et des TLR (panneau supérieur) et la voie Imd est apparentée à la voie du TNFα (panneau inférieur). Les modes d'activation des voies diffèrent, puisque par exemple les TLR reconnaissent directement les motifs de pathogènes alors que Toll est activé via la liaison de la cytokine spaetzle. Ces éléments suggèrent une origine ancienne des voies NF-κB dans les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire.

Chez la drosophile, les facteurs de transcription de type NF- κ B ont donc un rôle fondamental dans la réponse aux infections. Or, chez les mammifères, le rôle dans la régulation des réponses immunitaire de ces protéines est connu depuis plus de dix ans. Les principales voies conduisant à l'activation de facteurs de transcription de type NF- κ B chez les mammifères sont impliquées dans la réponse immunitaire (la voie du TNF α , la voie de l'IL1 (Interleukine 1) et la voie des TLR (Toll Like Receptor)). Depuis la découverte des TLR chez les mammifères, on sait que les voies de type NF- κ B sont impliquées à la fois dans l'immunité adaptative et aussi dans la détection directe des pathogènes et la modulation de la réponse innée et adaptative (Bonizzi et Karin, 2004). En plus de l'utilisation de facteurs de transcription de la famille NF- κ B par les drosophiles et les mammifères pour réguler la réponse immunitaire, il existe des similarités moléculaires frappantes entre la voie des TLR ou de l'IL1 et la voie Toll et entre la voie du TNF α et la voie Imd (Hoffmann, 2003). Une grande partie des composants intracellulaires des voies sont homologues entre les mammifères et la drosophile (figure i.2). Cependant, les modes d'activation des voies apparentées diffèrent, ils sont parfois directs par la liaison des pathogènes (TLR, PGRP-LC), parfois indirects via la liaison de cytokines aux récepteurs (Spaetzle, TNF α) (figure i.2). Ces données suggèrent très fortement une origine ancienne du rôle des protéines NF- κ B dans la régulation des réponses immunitaires.

De façon intéressante, on sait aujourd'hui que des homologues des protéines de type NF- κ B sont retrouvés chez des organismes tels que les cnidaires (Tom Gilmore, Keystone NF- κ B meeting, mars 2006), mais pas chez le ver *C. elegans*. Il a récemment été démontré qu'il existe chez la limule (qui est un fossile vivant d'arthropode (ancien de plus de 550 millions d'années)), une protéine de type I κ B, CrI κ B et deux facteurs de transcription de type NF- κ B, Cr NF- κ B et CrRelish. Suite à une infection par une bactérie à Gram négatif, I κ B est dégradé et CrNF- κ B est transporté dans le noyau (Wang *et al.*, 2006b). Ainsi, l'utilisation des voies de type NF- κ B pour lutter contre les infections a été mise en place très tôt au cours de l'évolution.

i.2.3. Les autres pathogènes ?

i.2.3.1. Les virus

Récemment, l'équipe de Jean-Luc Imler au laboratoire a choisi de s'intéresser à des pathogènes jusque là assez peu étudiés chez la drosophile, les virus. En effet, comme nous avons pu le constater en introduction, les virus font partie des pathogènes transmis par les insectes vecteurs et responsables de grandes endémies. Les progrès accomplis dans la compréhension des défenses antibactériennes et antifongiques des insectes grâce au modèle drosophile laissent espérer que l'étude des mécanismes de défense antiviraux de la drosophile pourrait aussi grandement faire progresser les connaissances au sujet des défenses antivirales des insectes. Ils ont pu démontrer que la

drosophile se défend effectivement contre les virus. Au niveau de la signalisation, une analyse par puces à ADN a montré que les gènes impliqués dans la réponse aux infections virales sont différents des gènes cibles des voies de type NF- κ B impliqués dans la réponse antibactérienne ou antifongique (Dostert *et al.*, 2005). Ces gènes sont en partie contrôlés par la voie de signalisation de type JAK/STAT. Cette voie n'est pas la seule à réguler la réponse à l'infection virale, car elle ne contrôle pas la transcription de l'ensemble des gènes répondant à l'infection (Dostert *et al.*, 2005). Plus récemment il a été démontré que l'ARN interférence est un mécanisme de protection des drosophiles contre les virus (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006a).

i.2.3.2. Les parasites protozoaires

L'étude des mécanismes moléculaires de défense contre les parasites n'a pas vraiment été conduite chez la drosophile, pour la raison simple que celle-ci n'est pas vraiment un modèle idéal d'insecte vecteur de parasites protozoaires (il faut noter qu'elle est un modèle bien étudié de parasites métazoaires tels que la guêpe *Leptopilina boulardi*, car ces parasites induisent la différenciation des lamellocytes (revu dans Meister et Lagueux, 2003)). Cependant, on peut noter une tentative de développer le modèle plasmodium chez la drosophile, plus aisée et mieux connue que les moustiques (Schneider et Shahabuddin, 2000). Les auteurs n'ont pas réussi à provoquer une infection après un repas de sang contenant des gamétocytes ou des ookinètes de *P. gallinaceum*. Par contre, des ookinètes injectés dans l'hémocoèle des drosophiles se différencient correctement en oocystes puis en sporozoïtes. Ces sporozoïtes sont fonctionnels et infectieux, mais ne rejoignent pas les glandes salivaires. Les auteurs n'ont pas réussi à observer d'induction des peptides antimicrobiens, ni de différence dans le développement de l'infection chez des mouches invalidées pour l'une des deux voies de signalisation, Toll ou Imd. Les auteurs ont pu montrer que les hémocytes étaient impliqués dans la destruction d'un certain nombre d'ookinètes par la drosophile. Ainsi cette étude montre la faisabilité d'un certain nombre de travaux sur le développement du plasmodium et en particulier des oocystes et des sporozoïtes chez la drosophile.

Cependant, le plasmodium utilisé dans cette étude n'est pas *P. falciparum*, et ce système reste très artificiel. Or aujourd'hui, il est possible de travailler avec les moustiques vecteurs, les techniques d'élevage étant au point ainsi qu'un certain nombre d'avancées techniques (ARN interférence, transgénèse...).

i.3. L'anophèle, modèle des interactions hôte-parasite chez les insectes

i.3.1. *Anopheles gambiae*

Les moustiques sont des diptères comme la drosophile et sont divisés en un certain nombre de genres dont les plus connus sont les *Culex*, les *Aedes* et les Anophèles.

Nous avons choisi au laboratoire de travailler sur le modèle *Anopheles gambiae*, car c'est le vecteur principal du paludisme. En particulier il est capable de transmettre le parasite *Plasmodium falciparum* responsable de l'ensemble de cas mortels de paludisme.

Le cycle de vie de l'anophèle est divisé en une phase aquatique larvaire, et une phase aérienne adulte. Les œufs sont pondus (figure i.3) par les femelles à

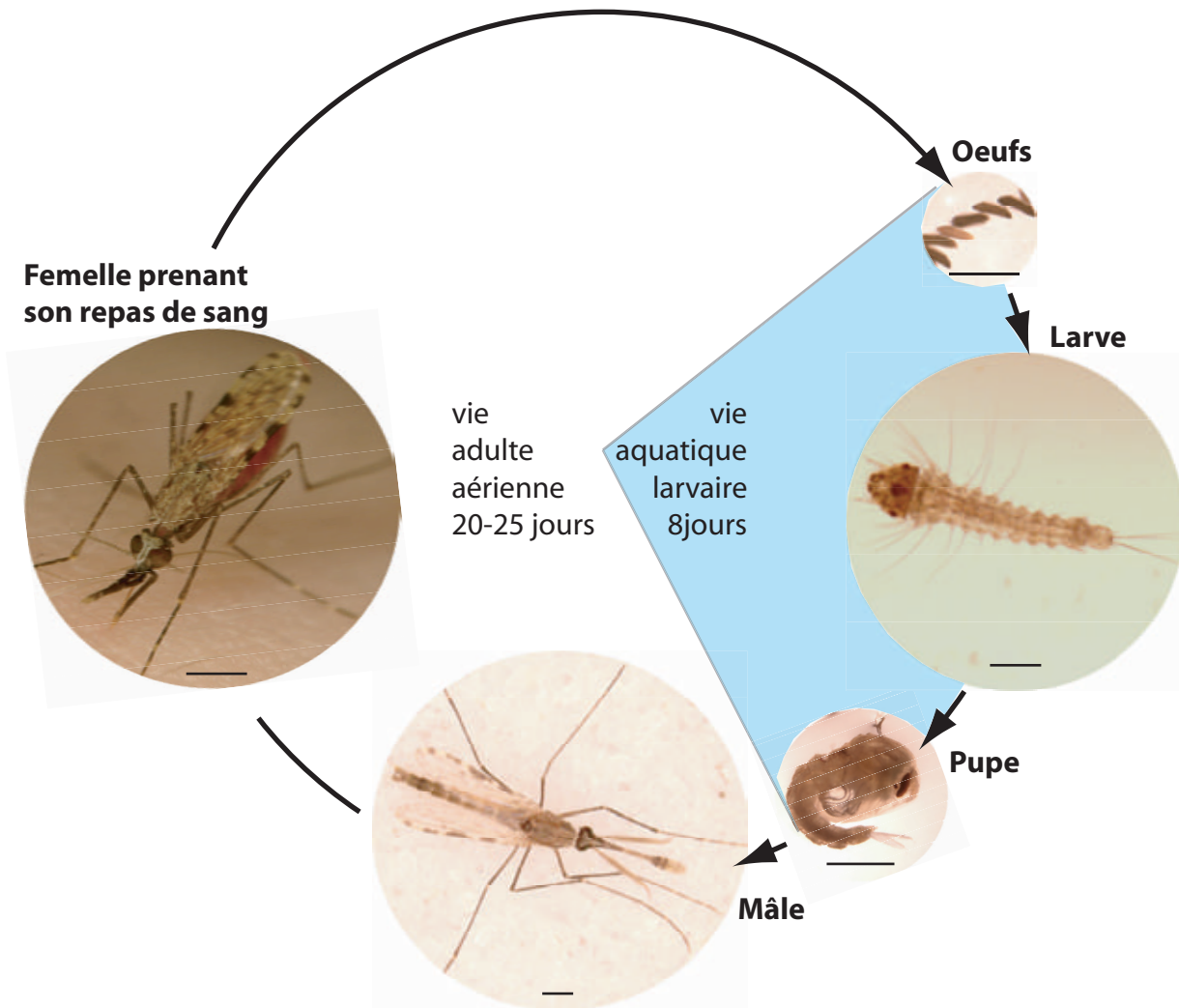


Figure i.3. Cycle de vie de l'anophèle. Les oeufs sont pondus sur l'eau et se développent en larves qui subissent ensuite 4 métamorphoses pour arriver au stade de pupes. Les adultes émergent après 24 à 48h des pupes. La femelle se nourrit de sang pour accomplir son ovogénèse. Echelle, 1mm. Photographies, N. Baldeck.

la surface de l'eau, sur laquelle ils flottent grâce à des coussins d'air. Ces œufs sont rapidement recouverts d'une couche de mélanine isolante et protectrice (en 30 minutes environ). L'éclosion peut se produire dès 24 h après la ponte, si l'environnement est favorable. 4 stades larvaires se succèdent ensuite. Les larves se nourrissent de microorganismes. Au bout d'une semaine, les larves de stade 4 subissent une métamorphose majeure et se transforment en pupes (figure i.3). Le stade pupal qui est l'équivalent des chrysalides mieux connues des papillons, permet à l'insecte de subir de nombreuses transformations afin d'émerger sous sa forme définitive d'adulte. Lors de ce stade, les anophèles ne se nourrissent pas. Les pupes sont mobiles. Le stade pupal dure de 36 à 48 h (en fonction de la photopériode principalement). A l'issue de cette étape, l'adulte mâle ou femelle émerge de la pupa et prend son envol (figure i.3).

Les adultes se nourrissent essentiellement sur du sucre (du nectar dans la nature). Les mâles ont une durée de vie plus courte que les femelles, ils sont plus petits et plus fragiles. Les femelles s'accouplent avec un seul mâle et gardent en réserve le sperme dans une spermathèque, ce qui leur permettra de féconder plusieurs séries d'ovules sans nouvel accouplement. Pour induire et mener à bien leur ovogénèse, les femelles doivent se nourrir de sang (ce qu'elles font dès 3 jours après l'éclosion) qui leur apporte un certain nombre d'éléments nutritifs essentiels pour cette tâche (protéines...) (figure i.3). A la suite du repas sanguin (environ 3 jours plus tard), les femelles pondent les œufs à la surface de l'eau. Les femelles vivent en moyenne entre 15 et 25 jours.

Il existe de nombreuses lignées d'*A. gambiae* et les techniques d'élevage sont maintenant bien maîtrisées. La lignée que nous utilisons principalement au laboratoire est la lignée G3, qui a été isolée en Gambie en 1975. Le génome de l'anophèle a été séquencé et publié en 2002 (Holt *et al.*, 2002). La souche séquencée est la souche PEST, issue du croisement de lignées du Nigeria et du Kenya. Cette lignée, actuellement perdue, présentait un fort polymorphisme, qui s'ajoute au polymorphisme déjà important qui existe chez l'anophèle. Ce polymorphisme est responsable du fait que la séquence publiée du génome correspond rarement à la séquence de la lignée G3.

Ainsi, aujourd'hui il est facile de travailler avec l'anophèle et le séquençage du génome d'*A. gambiae* rend les études comparatives aisées à conduire.

i.3.2. Le plasmodium

i.3.2.1. Cycle de vie des plasmodiums

Le cycle de vie de *P. falciparum* est connu depuis plus d'un siècle. Il est partagé comme celui de la plupart des plasmodiums entre un hôte vertébré et un moustique. Le moustique est l'hôte définitif dans lequel intervient la partie sexuée du cycle du plasmodium, alors que l'homme est le réservoir, dans lequel interviennent les multiplications asexuées du parasite. Chaque couple

plasmodium-moustique a ses spécificités, nous retracerons ici les grandes lignes du cycle de *P. falciparum* chez l'homme puis chez *A. gambiae*. Un des points importants de ce cycle est qu'il fait se succéder des phases invasives et des phases multiplicatives (figure i.4).

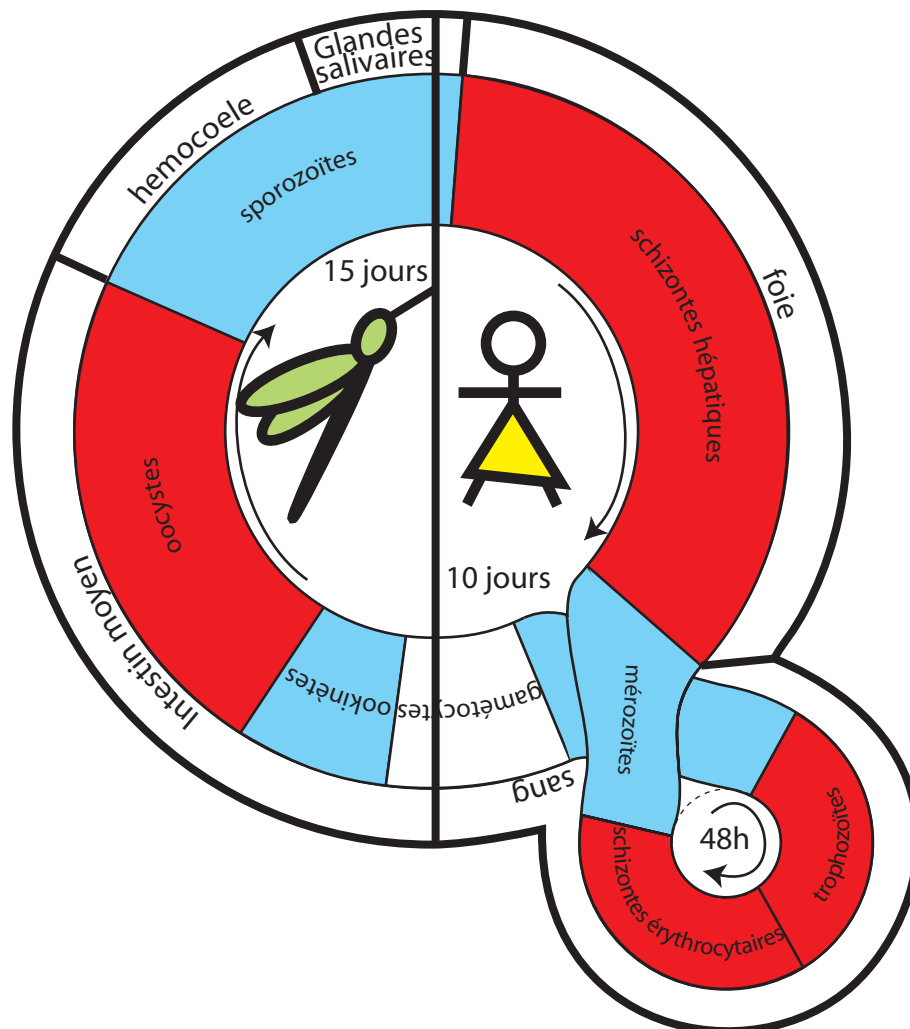


Figure i.4. Le cycle de *Plasmodium falciparum*. Le cycle de vie du plasmodium se déroule entre deux hôtes: le vecteur anophèle (à gauche de la figure), dans lequel se produit la partie sexuée du cycle et l'homme (à droite de la figure), réservoir du parasite. Après une piqûre infectieuse (en haut), les sporozoïtes injectés par l'anophèle dans la circulation sanguine rejoignent rapidement le foie où ils se transforment en schizontes. Ces schizontes éclatent vers 8 jours pour donner des milliers de mérozoïtes. Les mérozoïtes pénètrent dans les hématies où ils donnent des trophozoïtes. Ces trophozoïtes évoluent en schizontes qui éclatent pour donner de nouveaux mérozoïtes capables d'infecter les hématies. 10 jours après l'infection apparaissent dans le sang les formes infectantes pour le moustique, les gamétocytes. Ces gamétocytes sont ingérés lors d'un repas de sang et donnent des gamètes. La fécondation a lieu dans l'intestin moyen du moustique et donne naissance à un zygote mobile, l'ookinète qui peut traverser les cellules de l'intestin. L'ookinète qui a rejoint la partie basale de l'intestin se transforme en oocyste qui mature pour libérer environ 10 jours après l'infection des milliers de sporozoïtes. Les sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires, permettant de réaliser un nouveau cycle lors d'une prochaine piqûre. Le cycle de développement est ainsi partagé entre des phases d'amplification (en rouge) et des phases d'invasion (en bleu).

Le *Plasmodium* est transmis à l'homme lors de la piqûre d'un anophèle infectant, c'est-à-dire possédant dans ses glandes salivaires des sporozoïtes. Ces sporozoïtes sont injectés avec la salive lorsque le moustique pénètre l'épiderme à l'aide de ses pièces buccales adaptées. Les sporozoïtes rejoignent le foie, via la circulation sanguine, où ils se divisent puis évoluent en schizontes hépatiques. Arrivés à maturité au bout d'une dizaine de jours, ces schizontes éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes qui regagnent la circulation sanguine. Les mérozoïtes sont capables de pénétrer les hématies où ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes érythrocytaires contenant 16 ou 32 noyaux qui donnent un mérozoïte chacun lors de l'éclatement du globule rouge. Ces mérozoïtes peuvent à nouveau infecter des hématies saines. Ce cycle érythrocytaire dure 48 h et est responsable des phases de fièvre espacées de 3 jours lors d'un accès palustre. A partir de 10 jours après la piqûre infectante de l'anophèle, des gamétocytes dérivant des mérozoïtes peuvent apparaître dans le sang. Les gamétocytes sont les formes infectantes pour les anophèles. Ainsi, un sujet porteur de gamétocytes permet la propagation de l'infection à un nouvel anophèle. L'anophèle ingère avec son repas de sang ces gamétocytes mâles et femelles. Ces gamétocytes se trouvent dans l'intestin moyen (mésentéron) où ils évoluent en gamètes. Un gamétocyte mâle peut donner 8 gamètes après exflagellation. La fécondation donne naissance à un zygote qui évolue rapidement en ookinète, capable de traverser les cellules de la paroi intestinale. 48 h après l'infection, les ookinètes mûrissent en oocystes du côté de la membrane basale (en contact avec l'hémocoèle). Au sein des oocystes se déroulent deux méïoses puis de nombreuses mitoses. Au bout de 8 jours, les oocystes matures libèrent des milliers de sporozoïtes, qui rejoignent les glandes salivaires et peuvent infecter de nouveau un humain, moins de 15 jours après le premier repas sanguin infectant. L'anophèle reste alors infectant pour le reste de sa vie.

Il est intéressant de noter à ce stade que la durée de vie des anophèles est d'environ 3 semaines, c'est à dire quasiment la durée du cycle du plasmodium (puisque les anophèles se nourrissent pour la première fois de sang vers 2-3 jours). Afin de pouvoir assurer son rôle de vecteur, le moustique devra alors se nourrir sur un porteur de gamétocytes dès son premier repas.

i.3.2.2. Le modèle *P. berghei*

Nous avons choisi au laboratoire, pour des raisons de sécurité et de faisabilité, de commencer nos études avec le modèle *Plasmodium berghei*, déjà utilisé dans de nombreux laboratoires de recherche de part le monde. Le parasite *P. berghei* a été découvert en 1948 au Katanga (Congo) (Vincke *et al.*, 1948). Ce parasite est transmis par *Anopheles durenii* à des rongeurs (*Thammomys surdaster*) (Mouchet *et al.*, 2004). Ce parasite s'est bien adapté aux souris de laboratoire, et présente de nombreux avantages. Les moustiques sont nourris directement sur les rongeurs anesthésiés, et la culture cellulaire des parasites nécessaire lorsque l'on travaille sur *P. falciparum* en zone non endémique n'est donc pas nécessaire. Il faut aussi savoir que du fait de la grande

variabilité génétique des *Plasmodia*, travailler sur un clone de *P. falciparum* maintenu en culture cellulaire est également peu représentatif des conditions naturelles. Par ailleurs, les manipulations génétiques de *P. berghei* sont possibles et permettent donc de réaliser des souches déficientes pour un gène donné, ou bien exprimant une protéine fluorescente comme c'est le cas de la lignée que nous utilisons en routine (Franke-Fayard *et al.*, 2004). Néanmoins, nous garderons à l'esprit que ce parasite n'est pas l'agent du paludisme et les avancées qui pourront être faites dans la compréhension des interactions entre anophèle et plasmodium devront toujours être généralisées avec précaution puisque le couple *A. gambiae*-*P. berghei* n'a pas coévolué, *P. berghei* n'étant pas transmis par *A. gambiae* dans les conditions naturelles. Les travaux que nous réalisons au laboratoire sont donc des investigations essentiellement fondamentales sur la compréhension de la biologie des interactions entre un parasite particulier et un vecteur particulier, ce qui ne signifie pas que les connaissances que nous acquerrons ici ne pourront pas être utilisées pour éclairer d'autres champs de recherche plus appliqués sur le paludisme. Les travaux présentés ici n'auraient pas pu être réalisés de la même manière avec *P. falciparum*, mais ils permettront d'ouvrir de manière accélérée de nouveaux champs d'étude sur les interactions entre *A. gambiae* et *P. falciparum*.

i.3.3. Les interactions anophèle-plasmodium, quelques concepts des interactions hôte-pathogène

Une des particularités des invasions parasitaires pour leurs hôtes, est la poursuite du cycle de développement du parasite dans le vecteur. Ainsi, contrairement à une infection par une bactérie, qui se traduit par la multiplication de cette bactérie à l'identique dans l'organisme de l'hôte, une infection parasitaire va donner lieu à différentes formes parasitaires parfois très éloignées les unes des autres, par leur taille, leur morphologie et leur structure moléculaire et cellulaire. Certaines formes du parasite lui permettent d'envahir son hôte et d'autres de se multiplier. C'est pourquoi l'étude des interactions entre le vecteur anophèle et le parasite plasmodium est complexe, car elle sera influencée par le stade de développement du parasite.

Nous cherchons à connaître, des points de vue moléculaire et cellulaire, les bases de ces interactions entre le vecteur anophèle et le parasite plasmodium. Nous avons vu plus haut que le cycle de développement du plasmodium dans l'anophèle comprend la partie sexuée du cycle, ce qui fait de l'anophèle un hôte définitif pour le parasite. Au cours de son passage dans l'anophèle, le parasite se localise à différents endroits. La fécondation se passe dans la lumière de l'intestin moyen, puis le zygote mobile (ookinète) peut traverser l'intestin pour rejoindre l'hémocoèle sous une forme immobile, l'oocyste. Au sein de cet oocyste se produisent de nombreuses divisions

cellulaires, ce qui conduit à la production de milliers de sporozoïtes mobiles, qui peuvent rejoindre les glandes salivaires (revu dans Sinden, 2002). Les interactions entre l'anophèle et le plasmodium se situent donc à de nombreux niveaux : traversée de l'intestin par les ookinètes, maturation des oocystes dans l'hémocoèle, pénétration des glandes salivaires par les sporozoïtes. Ces interactions sont de plusieurs ordres : le parasite doit se nourrir pour assurer sa croissance, il doit se déplacer dans son hôte (via par exemple des interactions avec des composants cellulaires de l'hôte) et passer les différents obstacles qui se présentent à lui (barrières physiques, défenses..). Ces interactions moléculaires et cellulaires sont bien problématisées aujourd'hui, et certains évènements sont assez bien compris, notamment les conditions nécessaires pour que la fécondation ait lieu, mais la plupart restent méconnus (revu dans Sinden, 2002). La traversée de l'intestin par les ookinètes est extrêmement rapide, rendant assez difficile son analyse, la question de la route suivie par les ookinètes reste par exemple une question controversée (intracellulaire, extracellulaire ou les deux ?) (revu dans Whitten *et al.*, 2006). La manière dont les sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires est complètement inconnue.

La question que nous posons ici est celle des mécanismes éventuels de défense de l'anophèle contre le plasmodium. Les quantifications de parasites effectuées par le laboratoire de R. Sinden au cours de l'invasion sont particulièrement informatives sur ce point. En effet, il a travaillé sur le déroulement du cycle du plasmodium chez l'anophèle et a pu montrer qu'au

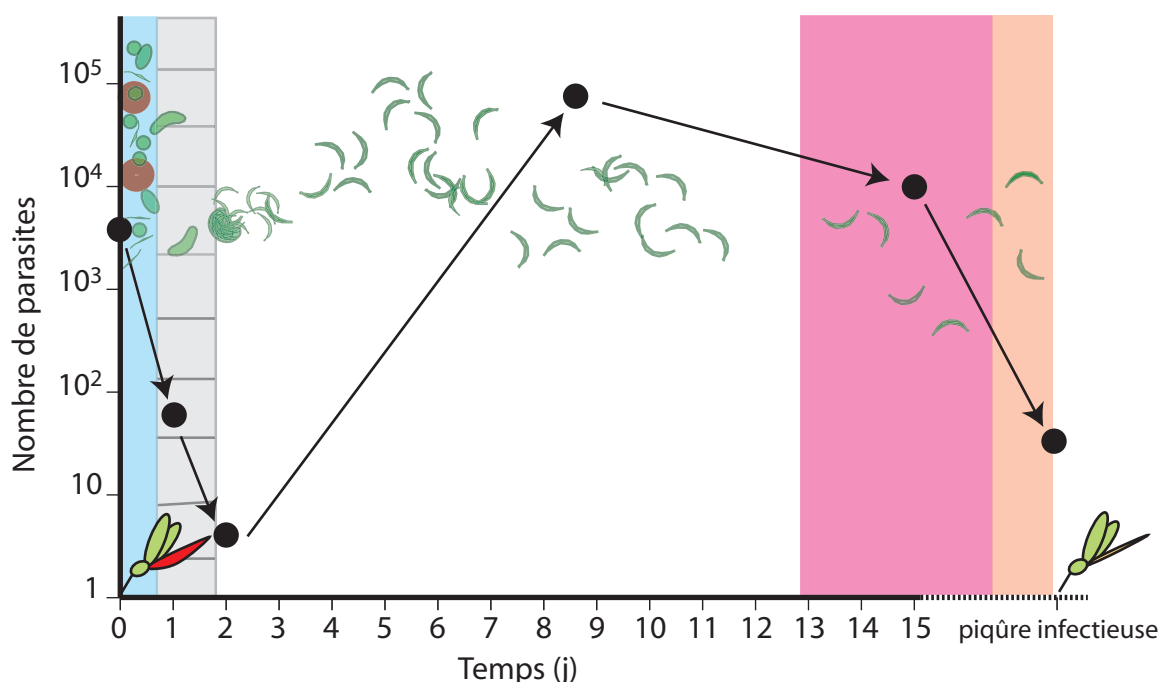


Figure i.5. Evolution du nombre de parasites au cours du développement de *P. berghei* chez *A. gambiae*. Le graphe représente le nombre d'individus au cours du temps. A gauche, les évènements qui interviennent dans l'intestin (représenté en bleu) entraînent de grandes pertes de parasite, puisque des quelques milliers de gamétozytes ingérés, seuls environ 5 deviennent des oocystes. Au sein des oocystes, les divisions cellulaires successives permettent d'atteindre un nombre extrêmement important de sporozoïtes (plus de 50000). Au final, une piqûre infectieuse contiendra entre 10 et 80 sporozoïtes. (d'après Sinden et Billingsley, 2001)

cours de son développement dans le moustique, le parasite subit de grandes pertes (Sinden, 1999, Sinden et Billingsley, 2001) (figure i.5). Notamment, la phase de traversée de l'intestin cause la perte de 97% des ookinètes. Entre l'ingestion des gamétocytes et le stade oocyste, 99,9% des parasites ont disparu. Suit ensuite une phase de divisions qui permet de multiplier par 10000 la quantité d'individus, sous forme de sporozoïtes. 20% des sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires. On a donc au cours du développement du plasmodium chez l'anophèle deux phases de pertes considérables : la traversée de l'intestin, puis l'accès aux glandes salivaires. Entre ces deux phases, il y a une phase d'amplification intense du nombre de parasites qui aboutit à la constitution d'un stock suffisamment important de sporozoïtes pour que l'infection puisse être propagée.

Notre laboratoire a choisi d'étudier la phase de traversée de l'intestin par les ookinètes pour essayer de comprendre si les pertes de parasite observées sont causées par des difficultés rencontrées par le parasite (barrières physiques...) ou par un système actif de défense immunitaire. L'hypothèse de ce travail est aussi que ce stade très sensible du développement du parasite pourrait être le moment idéal, via la modulation des défenses de l'anophèle, pour rompre le cycle parasitaire.

i.3.4. Y a-t-il chez le moustique une réponse immunitaire contre le plasmodium ?

Autant il est clair que l'hôte humain souffre de la présence du parasite *P. falciparum* puisqu'il est malade et peut en mourir, autant la question de savoir si l'anophèle est « malade » de cette infection reste une question controversée. Certains auteurs ont évoqué une baisse de la fécondité qui pourrait être liée à la compétition au sein de l'hôte pour les nutriments entre le parasite et le vecteur, ou à des mécanismes de modification de la physiologie de l'hôte en réponse au parasite ou provoquée par le parasite (revu dans Hurd, 2001). Beaucoup de questions restent pourtant sans réponse dans le cas des interactions anophèle-plasmodium. On ne sait pas si le développement du parasite a un effet positif ou négatif sur la durée de vie du moustique, si les pontes du moustique sont modifiées (quantité, viabilité), ou si l'invasion par le plasmodium provoque une grande consommation d'énergie de l'hôte pour se défendre. En revanche, il a été proposé que la présence des sporozoïtes dans les glandes salivaires modifie le comportement de l'anophèle qui a tendance à piquer plusieurs fois avant de réaliser son repas sanguin, propageant de fait plus efficacement l'infection (les sporozoïtes sont injectés lors de la phase de sondage de la peau) (Lacroix *et al.*, 2005). Ces questions extrêmement intéressantes des évolutions adaptatives entre parasite et vecteur sont donc encore largement sans réponses, en particulier parce qu'elles sont extrêmement complexes à étudier. Les modèles utilisés dans les laboratoires comme par exemple *A. gambiae*-*P. berghei* n'ayant pas coévolué, ils ne permettront pas d'approcher ce genre de problématiques. Cependant une

meilleure connaissance de ces modèles pourrait permettre de découvrir des mécanismes actifs, déclenchés par le vecteur ou par le parasite pour modifier la physiologie de l'un ou de l'autre.

Ce que l'on peut dire à ce sujet du modèle *A. gambiae* - *P. berghei*, c'est que si l'on réalise en parallèle un gorgement des anophèles sur une souris infectée par *P. berghei* ou sur une souris infectée par une souche de *P. berghei* non infectante, la survie des anophèles suite à ce gorgement n'est pas significativement modifiée, signifiant que la progression de l'infection par *P. berghei* chez *A. gambiae* n'affecte pas la survie des anophèles.

Ces interrogations ont conduit pendant longtemps à laisser en suspens la question de la réponse immunitaire éventuelle de l'anophèle contre le parasite plasmodium. En effet, si l'anophèle ne souffre pas de l'invasion par le parasite, alors pourquoi aurait-il besoin de se défendre contre ce parasite ? Depuis une dizaine d'années, des éléments concrets permettent de répondre plus précisément à cette question.

i.3.4.1. L'existence de lignées réfractaires

La famille des *Plasmodidae* comprend environ 80 espèces du genre *Plasmodium*. Le genre *Plasmodium* regroupe lui-même 3 sous-espèces qui sont des parasites de mammifères, d'oiseaux ou de reptiles (Mouchet *et al.*, 2004). Chaque plasmodium est transmis par un moustique vecteur spécifique. Les plasmodiums des oiseaux sont transmis par des moustiques de type *Culex* ou *Aedes*, les plasmodium des reptiles peuvent même être transmis par des phlébotomes (qui ne sont pas des moustiques). Les plasmodiums des mammifères sont exclusivement transmis par des anophèles. Il existe 458 espèces d'anophèles (Mouchet *et al.*, 2004). Parmi ces espèces, seules 70 à 80 sont des vecteurs de paludisme humain. *A. gambiae s.s* est l'un des vecteurs les plus efficaces au monde. Certaines espèces du complexe d'espèce *A. gambiae*, comme *A. arabiensis*, présentent une compétence vectorielle deux fois moindre dans certaines régions et équivalente dans d'autres (Mouchet *et al.*, 2004). On voit donc que le problème est extrêmement complexe, à cause de l'extrême variabilité génomique des anophèles et des plasmodiums. Cependant ce qu'il faut retenir, c'est que certains couples anophèles-plasmodium sont incompatibles. Ceci signifie donc qu'aux niveaux cellulaire et moléculaire, l'interaction entre le vecteur et son hôte nécessite un ajustement précis. On ne sait pas encore à ce niveau si il est question d'incompatibilités mécaniques, ou d'une meilleure défense de ces espèces.

En 1986, par sélection sur la lignée d'*A. gambiae* sensible G3, Franck Collins et ses collègues ont généré une lignée, qui a la particularité d'être complètement réfractaire au parasite *Plasmodium cynomolgi* (Collins *et al.*, 1986) et à de nombreux autres plasmodiums dont *P. berghei*. Cette lignée a la capacité de supprimer les ookinètes avant qu'ils ne se transforment en oocystes. Cette lignée est aussi capable de limiter la progression des ookinètes de certains clones de *P. falciparum*, sans toutefois les éliminer complètement.

Ceci est une première démonstration génétique de l'existence d'une immunité capable de supprimer *plasmodium* lorsqu'il est au stade ookinète. Ceci signifie donc que les anophèles ont la capacité de se défendre contre l'infection par le plasmodium et que ce mécanisme implique des protéines existant chez l'anophèle. Cette lignée a évolué et nous utilisons aujourd'hui la lignée L3-5 qui en dérive (Zheng *et al.*, 1997). De même que précédemment, les ookinètes qui traversent l'intestin des anophèles L3-5 sont lysés ou mélanisés avant d'atteindre le stade oocyste. Trois QTL (Quantitative Trait Loci) associés à cette résistance ont été isolés, *Pen1*, *Pen2* et *Pen3* (Zheng *et al.*, 1997). Il reste maintenant à analyser ces régions génétiques afin de corréliser le phénotype observé avec une explication moléculaire.

i.3.4.2. L'infection par *P. berghei* induit une réponse immunitaire spécifique

Le système immunitaire d'*A. gambiae* a commencé à être étudié au niveau moléculaire au début des années 1990 notamment sous l'impulsion de Fotis Kafatos à l'EMBL. La problématique de son équipe était centrée sur l'identification de protéines impliquées dans la réponse immunitaire des anophèles et le début des analyses a largement utilisé les connaissances acquises chez la drosophile, notamment sur les peptides antimicrobiens. Ainsi, par diverses techniques ont été caractérisés un homologue de Dorsal, Rel1 (appelé Gambif1 au départ) (Barillas-Mury *et al.*, 1996), une défensine (Richman *et al.*, 1996), et un homologue de GGBP (Gram Negative Bacteria-binding Protein) (Dimopoulos *et al.*, 1996). Ces premières études ont permis de disposer de marqueurs immunitaires qui ont été utilisés pour étudier l'infection par *P. berghei*. Il a ainsi été démontré que l'infection par *P. berghei* induit spécifiquement les gènes codant pour la défensine et l'homologue de GGBP ainsi qu'une sérine protéase (ISPL5) dans la lignée réfractaire L3-5 (Richman *et al.*, 1997). Ces gènes sont induits 24h après l'infection et cette induction est spécifique de l'infection par *P. berghei* et indépendante de toute infection bactérienne concomitante. Ainsi la première démonstration de l'induction d'une réponse immunitaire spécifique de l'infection par *P. berghei* était posée. Par contre à ce moment là, aucune étude directe n'avait encore permis de prouver que de fait, les gènes induits jouaient effectivement un rôle dans l'interaction avec *P. berghei*. Cette démonstration allait arriver quelques années plus tard.

i.3.4.3. Le phénotype de TEP1

Plus récemment, il a été démontré que la protéine TEP1 (ThioEster containing Protein 1) de l'anophèle, identifiée par homologie avec les TEPs de drosophile (pour lesquels aucune fonction claire n'est connue à ce jour) jouait un rôle dans l'immunité contre *P. berghei*. La protéine TEP1 fait partie de la grande famille des protéines du complément (facteurs C3, C4, C5,

α 2macroglobulines...). Elle possède un site thioester qui lui permet de se lier à la surface des bactéries (Levashina *et al.*, 2001). Lorsque l'ARNm codant pour la protéine TEP1 est déplété par ARN interférence, l'infection par *P. berghei* donne 3 à 4 fois plus d'oocystes dans l'intestin (Blandin *et al.*, 2004). Dans les conditions normales, TEP1 est détecté autour des ookinètes et lorsque TEP1 entoure complètement un ookinète, celui-ci est lysé et disparaît. Ainsi TEP1 est un des éléments qui limitent le nombre d'ookinètes dans l'intestin. Cette découverte est la première caractérisation moléculaire d'un élément du système actif de défense de l'anophèle contre le plasmodium. Ceci constitue donc la preuve que le parasite est bien combattu par le système immunitaire de l'anophèle et ouvre de nombreuses questions : comment le parasite est-il reconnu, quels sont les partenaires de TEP1, quelle proportion des ookinètes est détruite activement par le système immunitaire...

Depuis, d'autres molécules ayant des effets agonistes ou antagonistes sur la progression des ookinètes ont été décrites : LRIM1 (Leucine Rich repeat IMMune gene 1), qui de même que TEP1 peut limiter la progression des ookinètes (Osta *et al.*, 2004) et qui semble agir en collaboration avec TEP1 ; CTL4 (C-Type Lectin 4) qui au contraire a un effet agoniste et provoque une réduction du nombre d'oocystes lorsque le gène codant pour la protéine correspondante est invalidé (Osta *et al.*, 2004).

Les données présentées dans cette introduction montrent à quel point il est nécessaire de poursuivre les recherches fondamentales sur les insectes qui sont la cause d'un grand nombre de pathologies qui continuent de tuer dans de nombreuses régions du monde. Les bases de la compréhension de ces organismes ont été posées, notamment pour ce qui concerne le système immunitaire et il reste maintenant à utiliser les connaissances acquises sur l'insecte modèle drosophile pour comprendre notamment les nombreuses interactions entre les insectes vecteurs et les pathogènes de l'homme. Le paludisme est la maladie infectieuse la plus répandue et la plus mortelle pour les enfants dans les zones endémiques aujourd'hui. Un certain nombre de modèles sont disponibles pour travailler sur les interactions entre le vecteur anophèle et le protozoaire plasmodium. Les données acquises jusque-là ont permis de démontrer que l'anophèle module activement sa charge parasitaire en plasmodium. Aujourd'hui, seuls des effecteurs de cette réponse immunitaire sont connus. La question que nous allons poser dans cette thèse est celle de la régulation du système immunitaire de l'anophèle.

Nous allons essayer de répondre au cours de cette thèse aux questions suivantes :

- **Les voies de signalisation de type I κ B/NF- κ B sont elles conservées entre l'anophèle et la drosophile ?**
- **La fonction de ces voies de signalisation dans la réponse aux infections bactériennes et fongiques est elle conservée entre l'anophèle et la drosophile ?**
- **Ces voies de signalisation jouent elles un rôle dans la régulation de la réponse contre le plasmodium ?**

Nous avons choisi dans ce travail de thèse de nous placer aux niveaux cellulaires et moléculaires pour mettre au jour les voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de modulation de la réponse immunitaire des anophèles. La première partie de ce travail s'attachera à analyser la conservation fonctionnelle de la réponse immunitaire entre la drosophile et l'anophèle (chapitres I et II). Les données acquises dans cette première partie seront utilisées pour étudier l'immunité de l'anophèle vis-à-vis du plasmodium et démontrer que le niveau basal de cette immunité est un élément fondateur de sa défense (chapitre III). En modifiant le niveau de cette immunité basale, la progression du plasmodium peut être stoppée chez l'anophèle, et l'étude de ce mécanisme sera l'objet du chapitre IV.

Chapitre I

Analyse fonctionnelle comparative de MyD88 chez l'anophèle et chez la drosophile

Au début de ce travail, les recherches sur le système immunitaire de la drosophile conduites depuis le début des années 90 avaient permis d'en comprendre les mécanismes principaux. Les cascades Toll et Imd impliquées dans les réponses antibactérienne et antifongique chez la drosophile sont de type $I\kappa B/NF-\kappa B$. Ces cascades permettent la sécrétion de peptides antimicrobiens actifs contre ces microorganismes et sont activées par des molécules pouvant reconnaître directement des motifs de pathogène (GNBP, PGRP). Une des questions qui se posaient au début de ma thèse, au moment de la publication du génome d'*Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002) était de connaître le degré de conservation des cascades du système immunitaire entre la drosophile et l'anophèle. En effet, on pouvait imaginer que la quantité d'informations obtenues des études conduites chez la drosophile et l'expérience acquise allaient faciliter et accélérer l'investigation du système immunitaire de l'anophèle. La perspective d'utiliser ces données pour comprendre rapidement des problèmes complexes tels que la réponse immunitaire engagée suite à la pénétration d'un parasite était enthousiasmante. Grâce aux facilités d'élevage et de manipulation génétique qu'elle permet, la drosophile a été utilisée comme modèle pour étudier la réponse à une infection bactérienne ou fongique chez les insectes. La réponse à ces infections se divise généralement en une phase de reconnaissance, qui induit une signalisation conduisant à la suppression du pathogène. Le modèle drosophile n'a pas été utilisé pour comprendre les interactions hôte-pathogène dans le cadre d'une invasion par des parasites protozoaires. Ces infections ne conduisent pas à la suppression complète du parasite qui poursuit ensuite son cycle vital, et ne font pas nécessairement l'objet d'une réponse immunitaire. Le moustique anophèle se prête plus à ce type d'études, dans la mesure où il est un vecteur connu de nombreux parasites. Les connaissances sur les mécanismes moléculaires de reconnaissance, les voies de signalisation ainsi que les effecteurs utilisés par un insecte suite à la pénétration d'un parasite étant quasiment inexistantes, l'utilisation des données mises à jour par le séquençage du génome de l'anophèle laisse espérer que l'étude de la réponse immunitaire des insectes pourra être enrichie d'un nouveau champ.

On estime que les deux espèces de diptères, anophèle et drosophile ont divergé il y a 250 millions d'années. La séquence du génome de l'anophèle

a été publiée en 2002 et à l'occasion de cette publication, la question de la conservation du patrimoine génétique entre les deux espèces a été posée (Zdobnov *et al.*, 2002). Il s'est avéré que les deux génomes sont assez dissemblables si on compare leur divergence à celles classiquement observées chez les vertébrés. Ainsi, les deux espèces ont divergé rapidement, ce qui s'explique à la fois par la courte durée du cycle de vie de ces diptères, comparé aux vertébrés, mais aussi par les différences considérables de leurs modes de vie. Le cycle du moustique est partagé entre une vie aquatique larvaire et une vie adulte aérienne, alors que celui de la drosophile est entièrement aérien ; la femelle moustique est hématophage afin de réaliser son ovogénèse, ce qui n'est pas nécessaire pour la drosophile...

La question de la conservation des voies connues dans l'immunité a été posée lors de la publication du génome. Christophides *et al.* ont pu constater que la plupart des éléments intracellulaires des voies de signalisation Toll et Imd pouvaient être retrouvés chez l'anophèle, soit comme orthologues vrais, soit comme homologues (Christophides *et al.*, 2002). Par contre, certaines familles de gènes, notamment impliqués dans la reconnaissance, ont subi chez l'anophèle de grandes amplifications (fibrinogènes, protéines à thioester, GNBP (Gram Negative Bacteria-binding Proteins)) ou des réductions (PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins)). Les cibles prédites des cascades chez l'anophèle sont aussi différentes, puisque par exemple, certaines familles de peptides antimicrobiens sont communes (cecropines, défensines) et d'autres non (le peptide drosomycine est absent, le peptide gambicine apparaît). Il était donc plus facile de se concentrer sur la partie intracellulaire des cascades pour essayer d'entamer une étude comparative. En ce qui concerne la voie Toll, deux orthologues sont retrouvés, Cactus qui est un facteur de type I κ B et MyD88 qui est l'adaptateur de la voie chez la drosophile.

Nous avons choisi au début de ce travail de nous concentrer sur la protéine MyD88. DmMyD88 a été identifiée et caractérisée en culture cellulaire de drosophile (lignée S2) (Horng et Medzhitov, 2001) puis *in vivo* (Tauszig-Delamasure *et al.*, 2002) après la publication du génome de la drosophile, par homologie avec la protéine MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) déjà connue chez les mammifères pour interagir avec les TLR (Toll Like Receptors) (Medzhitov *et al.*, 1998). DmMyD88 possède comme MyD88 un domaine « Death » (Death Domain, DD) capable d'interagir avec d'autres domaines « Death » et un domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor) d'interaction avec les domaines TIR. En plus de ces deux domaines, la protéine DmMyD88 possède une extension C-terminale de 150 acides aminés qui est absente des protéines MyD88 des mammifères. Pour étudier le rôle de DmMyD88 dans l'immunité de la drosophile, Tauszig *et al.* ont utilisé une lignée transgénique (EP(2)2133) possédant un transposon dans le premier exon du gène *DmMyD88*, en 5' de l'ATG. La présence de cet élément P entraîne la disparition quasi complète du transcrit du gène *DmMyD88*. Les drosophiles possédant cette insertion de transposon sont incapables de produire le peptide drosomycine qui est le marqueur de l'activation de la voie Toll après une infection fongique.

Elles sont aussi extrêmement sensibles aux infections provoquées par des bactéries à Gram positif (*S. faecalis*) ou par des champignons (*B. bassiana*). Ces expériences ont permis de démontrer que DmMyD88 est donc un des acteurs de la voie Toll pour l'immunité. Il a été proposé que DmMyD88 est l'adaptateur qui lie le récepteur Toll via son domaine TIR et signale à Tube via son domaine « Death » (figure I.1.b), il fait donc partie du complexe récepteur de cette cascade de signalisation.

La voie Toll de la drosophile présente la particularité d'être aussi utilisée au cours du développement pour la mise en place de l'axe dorso-ventral chez l'embryon. La plupart des composants de cette voie ont été découverts par hasard lors de la mise au point d'un crible par mutagenèse (Anderson et Nusslein-Volhard, 1984). Les femelles mutantes identifiées sont stériles et produisent des embryons qui ont des défauts de polarité dorso-ventrale. Deux types de mutations ont été obtenus. D'une part, des embryons présentant un phénotype appelé phénotype dorsalisé, qui développent uniquement des éléments dorsaux et qui ne possèdent pas les denticules caractéristiques

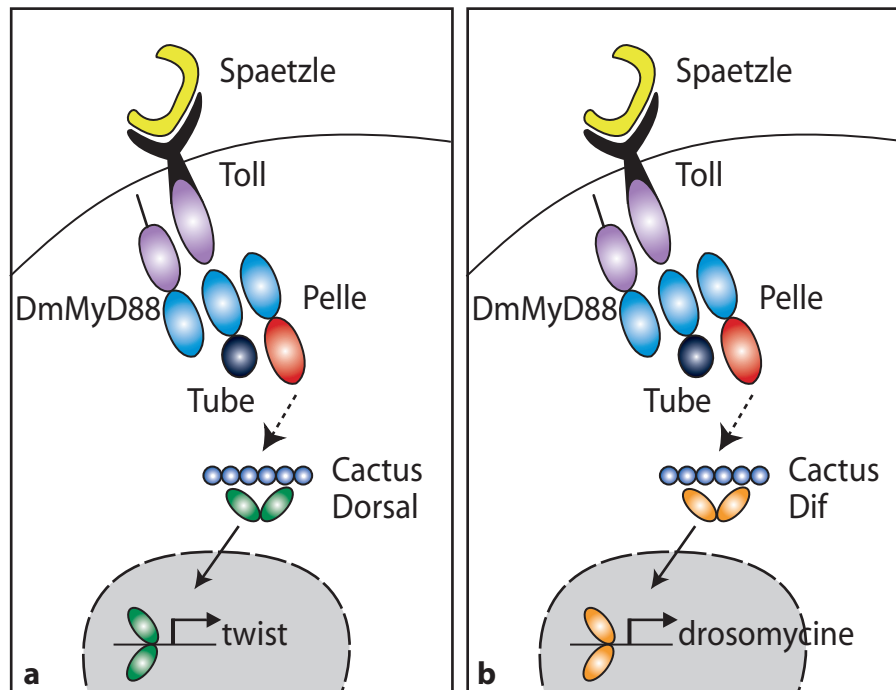


Figure I.1. La voie Toll de la drosophile. a. Chez l'embryon. **b.** Chez l'adulte. Dans les deux cas, une cascade protéolytique conduit à la liaison de Spaetzle au récepteur Toll. Cette liaison entraîne l'activation du récepteur qui via son domaine TIR (ici en violet) peut interagir avec DmMyD88. DmMyD88 via son domaine "Death" (en bleu) engage des interactions avec Tube et Pelle qui possèdent aussi des domaines "Death". Pelle possède un domaine kinase (en rouge), et via un mécanisme encore inconnu, son activation entraîne *in fine* la phosphorylation puis la dégradation de Cactus, provoquant la translocation de Dorsal (principalement chez l'embryon, mais pas seulement) ou de Dif (chez l'adulte lors de la réponse immunitaire) dans le noyau, et la transcription consécutive de gènes cibles spécifiques de chacun de ces facteurs.

de la partie ventrale. D'autre part, des embryons présentant un phénotype inverse, appelé ventralisé, où sont présents uniquement des denticules ventrales et absents les éléments caractéristiques de la partie dorsale. Dans tous les cas, ces embryons ne sont pas viables. Le phénotype dorsalisé avait été décrit précédemment chez les femelles mutantes pour le gène *dorsal* (Nüsslein-Volhard, 1979). La plupart des mutations recensées lors de cette mutagenèse (8 groupes de complémentation au total) entraînent ce phénotype dorsalisé. Un seul groupe de complémentation présente un phénotype ventralisé (Schupbach et Wieschaus, 1989). La présence de nombreux denticules ventraux sur ces embryons ventralisés évoque l'aspect d'un cactus, d'où le nom de ce mutant et du gène correspondant, *cactus*. Tous ces phénotypes (ventralisés, dorsalisés) sont dûs à l'absence des ARN maternels correspondants dans les embryons. Après la caractérisation de ces mutants, de nombreux travaux ont permis de montrer que les éléments identifiés appartiennent à une même voie de signalisation, la voie Toll, qui permet de distribuer un certain nombre de facteurs spécifiant la dorsalisation lors du développement (revu dans Moussian et Roth, 2005). *Dorsal* est le facteur de transcription de la voie, c'est un facteur de type NF- κ B. Les effets de ce facteur de transcription sont dépendants de ses interactions avec le répresseur cytoplasmique de type I κ B, *Cactus* (figure I.1.a).

Il a été démontré par la suite qu'une partie de la cascade Toll est utilisée lors de la réponse immunitaire de la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1996). Notamment, la cytokine Spaetzle, le complexe récepteur (Toll, Tube, Pelle) et *Cactus*. Ceci a logiquement conduit à poser la question du rôle de l'adaptateur *DmMyD88* dans le développement. Kambris *et al.* (Kambris *et al.*, 2003) ont étudié le rôle de *DmMyD88* dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de la drosophile. Ils ont constaté que le mutant (EP(2)2133) utilisé préalablement (Tauszig-Delamasure *et al.*, 2002) pour l'étude de la réponse immunitaire ne présente pas de phénotype développemental. Cependant ils disposaient aussi d'un mutant possédant une insertion de transposon dans le dernier exon de *DmMyD88* (*DmMyD88*^{PBc03881} que l'on appellera plus simplement *DmMyD88*^{-/-}). Cette insertion entraîne la traduction d'une protéine tronquée, possédant le domaine « Death » et le domaine TIR, mais pas l'extrémité C-terminale. Ils ont pu confirmer que la protéine tronquée est traduite et stable, et que les drosophiles *DmMyD88*^{-/-} présentent le même phénotype immunitaire que décrit précédemment. Par ailleurs, elles sont stériles et leurs embryons présentent un phénotype dorsalisé. Ainsi la protéine *DmMyD88* a un rôle fondamental de transduction du signal à la fois lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral et dans la réponse immunitaire. *DmMyD88* est donc l'adaptateur unique de la voie Toll. Ces expériences démontrent le rôle fondamental de l'extrémité C-terminale de *DmMyD88* (dont ces mutants sont dépourvus) dans le développement et dans l'immunité et révèlent une différence de fonctionnement avec les protéines *MyD88* des mammifères qui en sont dépourvues. Il faut noter qu'à peu près au même moment, une équipe indépendante utilisant d'autres allèles mutants de *DmMyD88* a pu démontrer

de la même façon l'importance du rôle de DmMyD88 dans le développement embryonnaire (Charatsi *et al.*, 2003). Ils ont aussi démontré par double hybride que DmMyD88 interagit avec Tube mais pas avec Pelle.

Nous sommes intéressés par l'étude de la conservation fonctionnelle des cascades de type NF- κ B connues pour leur rôle dans l'immunité chez la drosophile. L'adaptateur d'une de ces cascades, DmMyD88 possède un orthologue chez l'anophèle (AgMyD88) donnant ainsi une opportunité de traiter cette question. Nous avons envisagé cette problématique sous plusieurs angles. Dans un premier temps, nous avons utilisé les données de l'analyse du génome pour approfondir l'étude bioinformatique de la séquence protéique d'AgMyD88, et comparer les domaines remarquables des deux protéines MyD88 de drosophile et d'anophèle. Cependant, cette étude ne serait d'aucune utilité si elle n'était couplée à une analyse fonctionnelle de la protéine AgMyD88. Pour réaliser cette analyse, plusieurs approches sont possibles. Nous avons choisi tout d'abord d'utiliser l'organisme modèle drosophile pour voir si AgMyD88 pouvait remplir les fonctions de DmMyD88. Pour cela nous avons réalisé les expériences classiques de sauvetage d'un phénotype mutant de drosophile par la protéine d'anophèle. Nous verrons au chapitre II qu'il est aussi possible de réaliser une analyse fonctionnelle de MyD88 chez l'anophèle en déplaçant son transcrit par la technique d'ARN interférence. Ceci nous permettra de tester directement chez le moustique l'importance de cette protéine dans l'immunité.

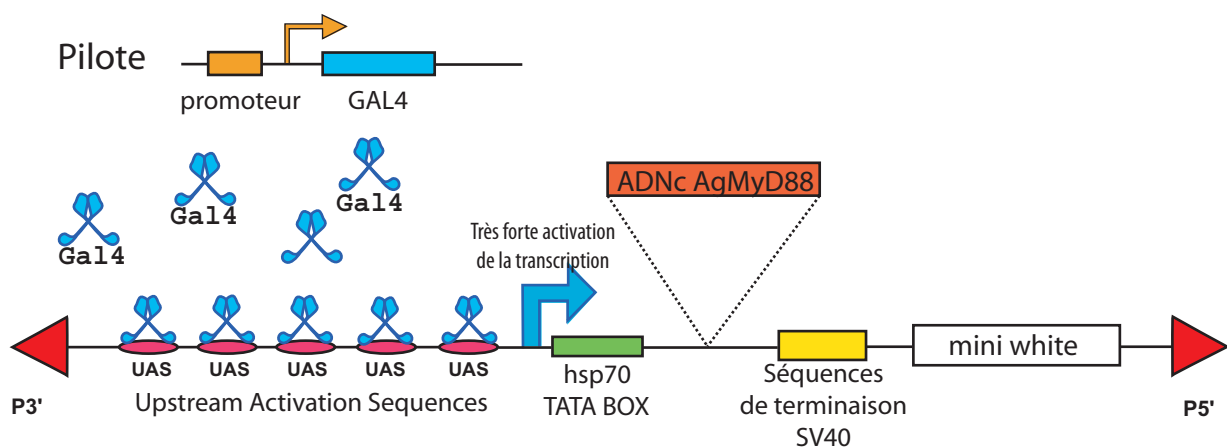


Figure I.2. Le système de surexpression UAS-Gal4. Cette construction en deux éléments (pilote et gène d'intérêt) permet d'activer fortement la transcription d'un gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur de choix. Le pilote comprend un promoteur suivi du gène codant pour la protéine Gal4. La protéine Gal4 est composée d'un domaine de liaison à l'ADN (aux séquences palindromiques UAS) et d'un domaine d'activation de la transcription. L'ADNc du gène d'intérêt (ici codant pour AgMyD88) est cloné dans un élément P contenant en amont des séquences UAS et un promoteur.

I.1. Matériel et méthodes

I.1.1. Analyse bioinformatique

Les séquences des protéines MyD88 de plusieurs organismes ont été utilisées :

- Mammifères : *Bos Taurus* (NCBI : AAY22119), *Homo sapiens* (NCBI : AAC50954), *Mus musculus* (NCBI : AAC53013)
- Insectes : *Anopheles gambiae* (ENSANGP00000015749), *Aedes aegypti* (25112.m02480 (le génome de *A. Aegypti* n'est pas encore publié, il s'agit d'un nom provisoire utilisé pour la version non annotée http://pre.ensembl.org/Aedes_aegypti/index.html)), *Apis mellifera* (NCBI : XP_396644), *Drosophila melanogaster* (FBgn0033402), *Drosophila pseudoobscura* (NCBI : EAL25641)

Les programmes CD search (Marchler-Bauer et Bryant, 2004) et ScanProsite (<http://www.expasy.org/prosite/>) ont permis d'identifier les domaines caractéristiques.

Le logiciel utilisé pour les alignements de séquences est ClustalX (version 1.83) qui est une interface graphique pour le programme ClustalW. Ce programme est téléchargeable à <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>.

Le programme TreeviewX (version 0.5.0 disponible en ligne <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) a été utilisé pour visionner les phylogrammes.

I.1.2. Lignées de drosophiles

I.1.2.1. Le système UAS-Gal4

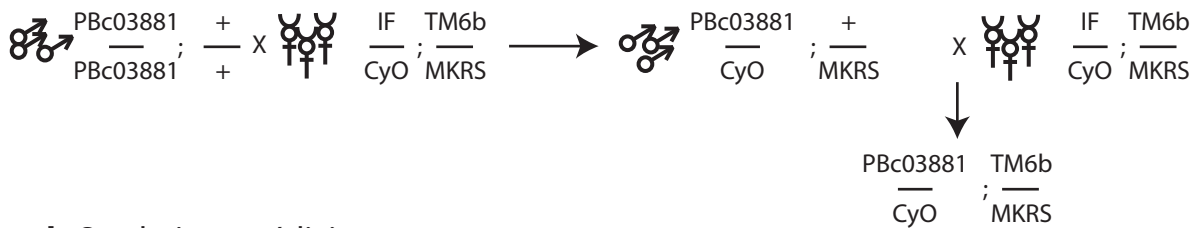
Afin de connaître le degré de conservation fonctionnelle de l'adaptateur MyD88 entre l'anophèle et la drosophile, nous avons choisi de surexprimer la protéine MyD88 d'*Anopheles gambiae* chez la drosophile. Pour cela nous avons utilisé le système de surexpression UAS-Gal4 (figure I.2).

Ce système permet d'exprimer fortement un gène d'intérêt sous le contrôle d'un pilote. Le pilote est composé d'un promoteur de choix suivi du gène codant pour la protéine de levure Gal4. Le promoteur utilisé dans le pilote est choisi en fonction de ses propriétés, notamment en termes de patron d'expression, de temporalité d'expression, de quantité d'expression...

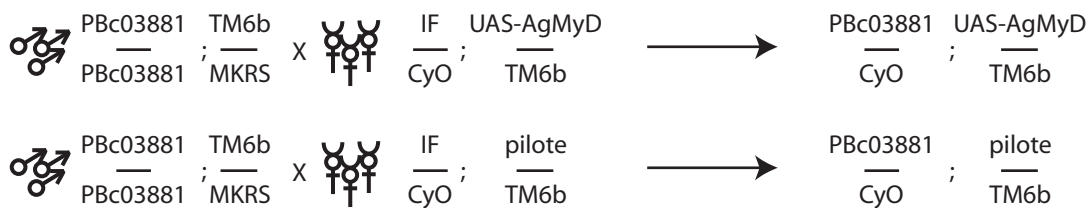
Dans notre cas, nous avons choisi deux promoteurs ubiquitaires, le promoteur du gène *daughterless* (*Da*) et celui du gène codant pour une protéine de choc thermique (Heat Shock Protein 70 (*hsp*)). Le promoteur *Da* est ubiquitaire et constitutif alors que le promoteur *hsp* est ubiquitaire mais inductible après un choc thermique à 37°C. Le promoteur *hsp* est fuyant en

l'absence de choc thermique, permettant de réaliser ainsi une surexpression modérée. Toutes nos expériences ont été réalisées en absence de choc thermique pour distinguer entre une surexpression forte (avec le pilote *DaG4*) et une expression plus proche des conditions physiologiques (avec le pilote *hspG4*).

a. Stocks balancés (tous les stocks seront balancés de cette manière)



b. Stocks intermédiaires



c. Croisements finaux

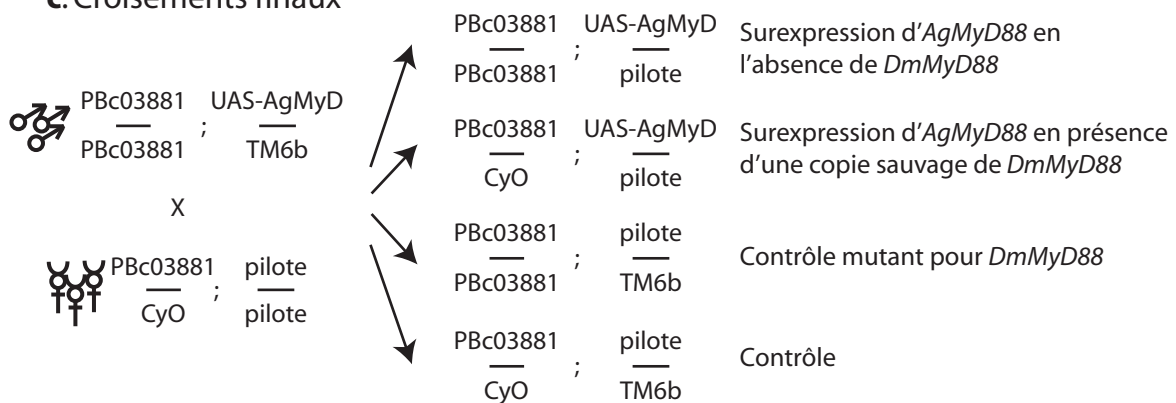


Figure I.3. Principes des croisements réalisés. **a.** Les stocks sont balancés de manière à pouvoir ensuite contrôler la présence de tel ou tel allèle sur tel ou tel chromosome. Les balanciers utilisés ici sont TM6b, CyO, et MKRS. Leur présence entraîne systématiquement un caractère phénotypique particulier. PBc03881 est l'allèle mutant pour *DmMyD88* que nous avons utilisé. IF est un marqueur. **b.** Des stocks pouvant être maintenus et amplifiés sont construits. **c.** Ces stocks peuvent être croisés pour donner les mouches utilisées pour les expériences.

I.1.2.2. Obtention des lignées transgéniques

L'ADNc d'*AgMyD88* utilisé est contenu dans l'EST NAP1-P48-G06 (Dimopoulos *et al.*, 2002) clonée dans le vecteur pT3T7 (pLL84). Cette EST de 1664 paires de bases (pb) a été clonée dans pUAST, le vecteur utilisé pour la transgénèse (Brand et Perrimon, 1993) entre EcoRI et NotI pour donner le vecteur pLL86 qui a été injecté aux embryons de drosophiles. Ce vecteur contient un élément P capable de s'insérer dans le génome de la drosophile.

Deux lignées contenant une insertion de l'élément P ont été obtenues, UAS-MyD5 et UAS-MyD4 (elles seront respectivement appelées UAS-*AgMyD88*-1 et UAS-*AgMyD88*-2). L'insertion est dans les deux cas située sur le chromosome III.

I.1.2.3. Lignées de drosophiles et croisements

Les lignées utilisées serviront lors des expériences de surexpression de *DmMyD88*. Afin de limiter les effets du fond génétique des drosophiles, les croisements ont été conduits de manière à ce que les contrôles des différentes expériences en soient issus. En effet, le fond génétique peut être assez variable d'une souche à l'autre de drosophile, entraînant notamment de grandes variabilités dans les résultats de survie. L'introduction de chromosomes tels que les balanceurs utilisés pour empêcher la formation de crossing-overs modifie aussi la sensibilité des drosophiles à l'infection.

La souche mutante pour *DmMyD88* utilisée est la même que celle utilisée par Kambris *et al.*, nous l'appellerons *DmMyD88*^{-/-}. Cette lignée possède une insertion de transposon (PBc03881) à la fin du gène, qui conduit à la production d'une protéine tronquée, privée d'extrémité C-terminale.

Les croisements réalisés (figure I.3) permettent d'obtenir des drosophiles surexprimant *AgMyD88* en contexte mutant pour *DmMyD88* endogène. Ils permettent aussi d'obtenir tous les contrôles associés à ces expériences de sauvetage.

I.1.3. Infections

Les infections sont réalisées avec le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (souche 80.2, (Lemaitre *et al.*, 1997)). Les drosophiles sont secouées sur une culture fongique sporulente, transférées dans des tubes de culture et laissées à 29°C le temps de l'infection. Pour les expériences de survie, les mouches survivantes sont comptées chaque jour et le tube est changé tous les deux jours. Pour suivre l'activation de la réponse immunitaire, les drosophiles sont collectées 48h après l'infection.

I.1.4. Northern blotting

L'ARN de 10-15 mouches est extrait après broyage dans le TRizol® (Invitrogen). 20 µg de l'ARN extrait sont utilisés pour le dépôt sur un gel d'agarose à 1% qui après migration est transféré par capillarité sur une membrane de nylon. Cette membrane est hybridée successivement avec des sondes d'ADN marquées radioactivement, préparées grâce au kit Rediprime II (Amersham).

Les matrices servant à générer les sondes sont préparées par PCR sur de l'ADNc avec les oligomères suivants :

drosomycine-L : AGCTCCGTGAGAACCTTTTCC,

drosomycine-R: CATCCTTCGCACCAGCACTTC,

rp49-L: ATACAGGCCCAAGATCGTGA,

rp49-R: GTGTATTCCGACCACGTTACA,

Pour *AgMyD88*, la sonde est préparée à partir d'une coupure du vecteur pLL84 avec les enzymes EcoRI et PstI ce qui donne un fragment de 702 paires de bases d'ADNc d'*AgMyD88*.

I.1.5. Préparation de cuticules d'embryons

Les femelles sont laissées à pondre pendant 24 h et les embryons âgés de 24 à 48 h sont collectés. Ils sont lavés dans l'eau, déchorionés dans la javel à 50% puis observés au microscope.

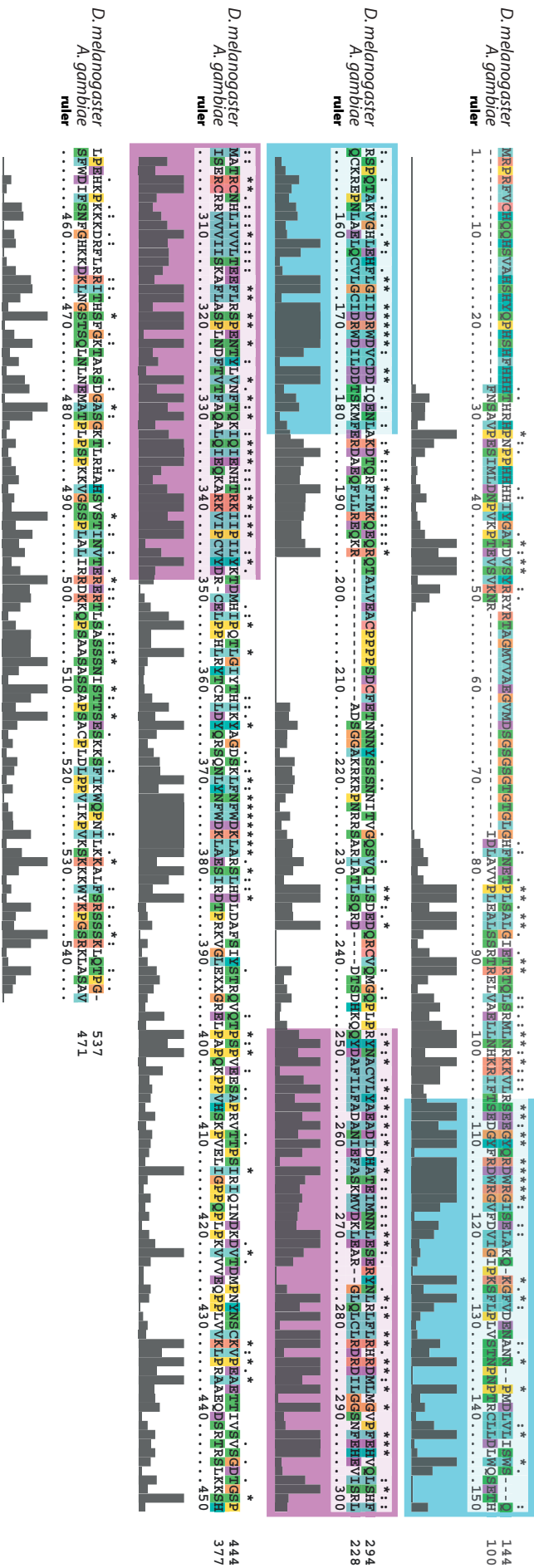


Figure 1.5. Alignement par Clustal X des protéines MyD88 de drosophile et d'anophèle. Le domaine "Death" est surligné en bleu et le domaine TIR est surligné en violet. Ces domaines sont fortement conservés. La queue C-terminale présente plus d'hétérogénéités.

I.2. Résultats

I.2.1. Comparaison bioinformatique des protéines MyD88 d'anophèle et de drosophile

Lors de l'annotation du génome d'*A. gambiae*, un certain nombre de gènes ont été répertoriés pour leurs ressemblances avec des gènes de la drosophile et annotés comme tels. Le gène codant pour l'adaptateur MyD88 en fait partie, avec un orthologue prédit chez l'anophèle (AgMyD88) dont la séquence est disponible sur la base de donnée Ensembl. La séquence prédite d'AgMyD88 est plus courte (410 acides aminés (aa)) que celle de DmMyD88 (537 aa). Il faut garder à l'esprit que les prédictions réalisées sur un génome total sont forcément approximatives et il peut donc être utile pour affiner ces prédictions de comparer les séquences avec d'autres séquences disponibles (Banques de cDNA, EST...). Pour MyD88, nous disposons d'un clone EST NAP1-P48-G06 (Dimopoulos *et al.*, 2002)(pLL84) qui permet la prédiction d'une protéine de 471 acides aminés. Nous avons donc choisi de réaliser les analyses à partir de cette séquence.

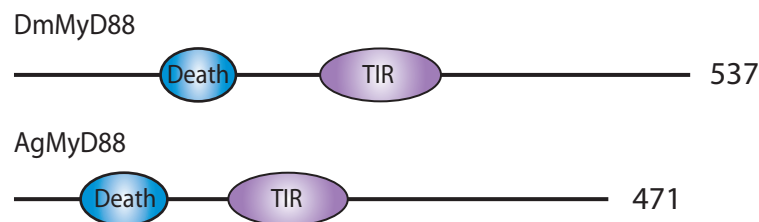


Figure I.4. Comparaison des domaines remarquables des protéines MyD88 de drosophile et d'anophèle. Les domaines fonctionnels "Death" et TIR sont présents chez les deux protéines. Ils sont très conservés avec respectivement 33 et 40% d'identité. AgMyD88 est l'orthologue de DmMyD88.

Une analyse des domaines fonctionnels présents chez AgMyD88 démontre la présence d'un domaine « Death » (death domain, PS50017), entre les acides aminés 63 et 131 et d'un domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor, smart00255), entre les acides aminés 178 et 310. Ces éléments sont situés chez DmMyD88, respectivement entre les aa 117 et 175 et les aa 242 et 375 (figure I.4). Une analyse par ClustalX (figure I.5) permet de comparer les protéines DmMyD88 et AgMyD88 sur toute leur longueur. Cette analyse montre que les domaines conservés entre les deux protéines sont exclusivement le domaine « Death » (33% d'identité) et le domaine TIR (40% d'identité). L'identité entre les deux protéines sur l'intégralité de la séquence n'est que de 20%. Les extrémités C-terminales des deux protéines ont exactement la même longueur (environ 150 aa), mais sont très différentes du point de vue de

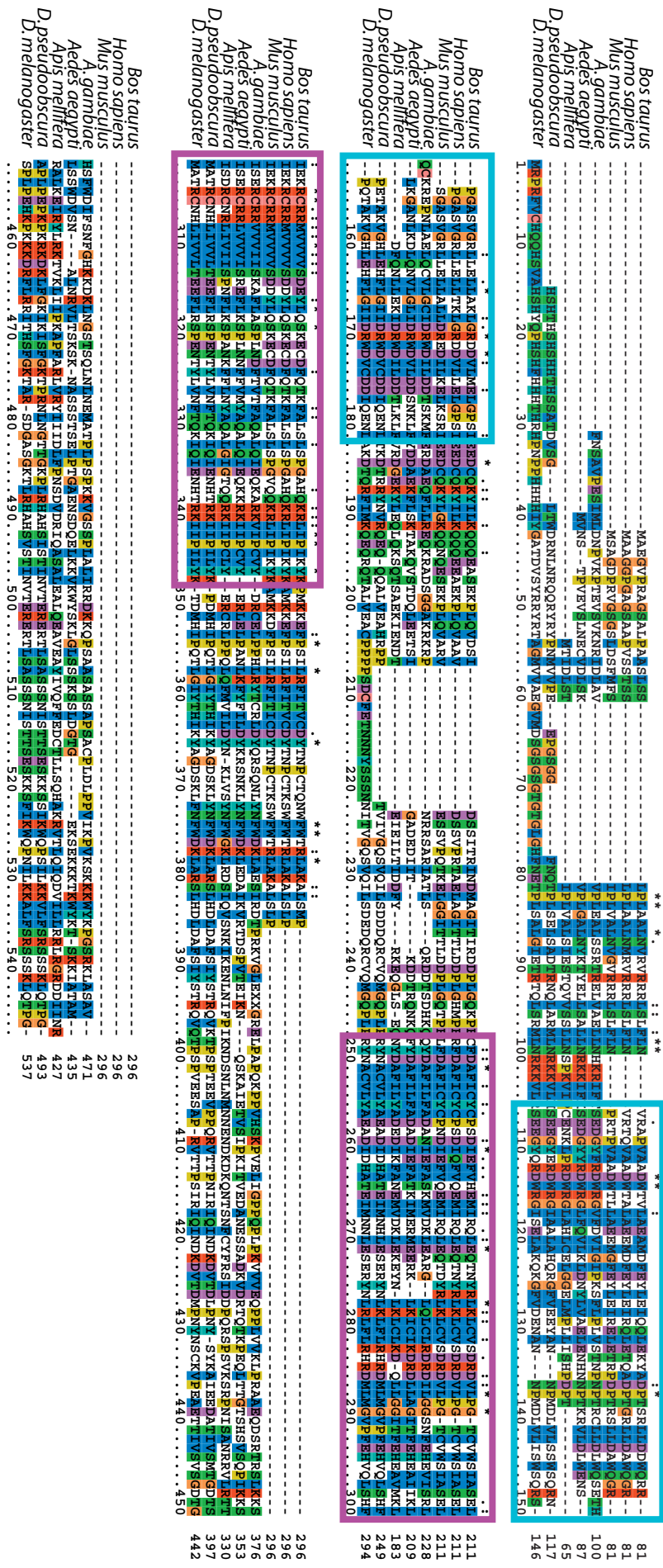


Figure I.6. Alignement par Clustal X des protéines MyD88 de différents organismes. L'extrémité N-terminale est en partie spécifique de DmMyD88. Les domaines "Death" (entouré en bleu) et TIR (entouré en rose) sont les plus conservés entre les espèces. L'extrémité C-terminale est absente des protéines de mammifères et restreinte aux protéines d'insectes. Il ne semble pas y avoir de signature caractéristique de cette extrémité C-terminale.

leur séquence, et ne présentent pas de domaine remarquablement conservé. À ce jour, la fonction de cette extrémité C-terminale n'est pas connue.

Pour élargir cette analyse, un alignement des protéines d'*Aedes aegypti* (Aa), *Anopheles gambiae* (Ag), *Apis mellifera* (Am), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Drosophila pseudoobscura* (Dp), *Mus musculus* (Mm), *Homo sapiens* (Hs), *Bos taurus* (Bt) a été réalisé par ClustalX (figure I.6). Cet alignement montre bien que les différences remarquables entre les protéines MyD88 se trouvent dans leurs parties N et C-terminales. La partie N-terminale de la protéine MyD88 de drosophile est plus longue de 60 acides aminés que l'ensemble des autres. La partie C-terminale est quant à elle restreinte aux MyD88 d'insectes. Sa longueur est assez conservée puisqu'elle fait environ 150 aa chez tous les insectes. Par contre, aucune région conservée n'est retrouvée et l'alignement des extrémités C-terminales montre qu'elles possèdent peu voire pas de ressemblances par rapport aux régions des domaines remarquables « Death » et TIR. Un phylogramme (figure I.7) construit à partir de chacun de ces domaines confirme qu'il y a une forte pression de conservation des domaines « Death » et TIR mais pas de l'extrémité C-terminale (comparer la longueur des bras qui traduit la dissemblance des domaines). Cela ne signifie pas que cette région n'est pas importante, mais montre qu'elle a peut-être été moins assujettie à une pression sélective, ce qui lui a permis d'évoluer différemment.

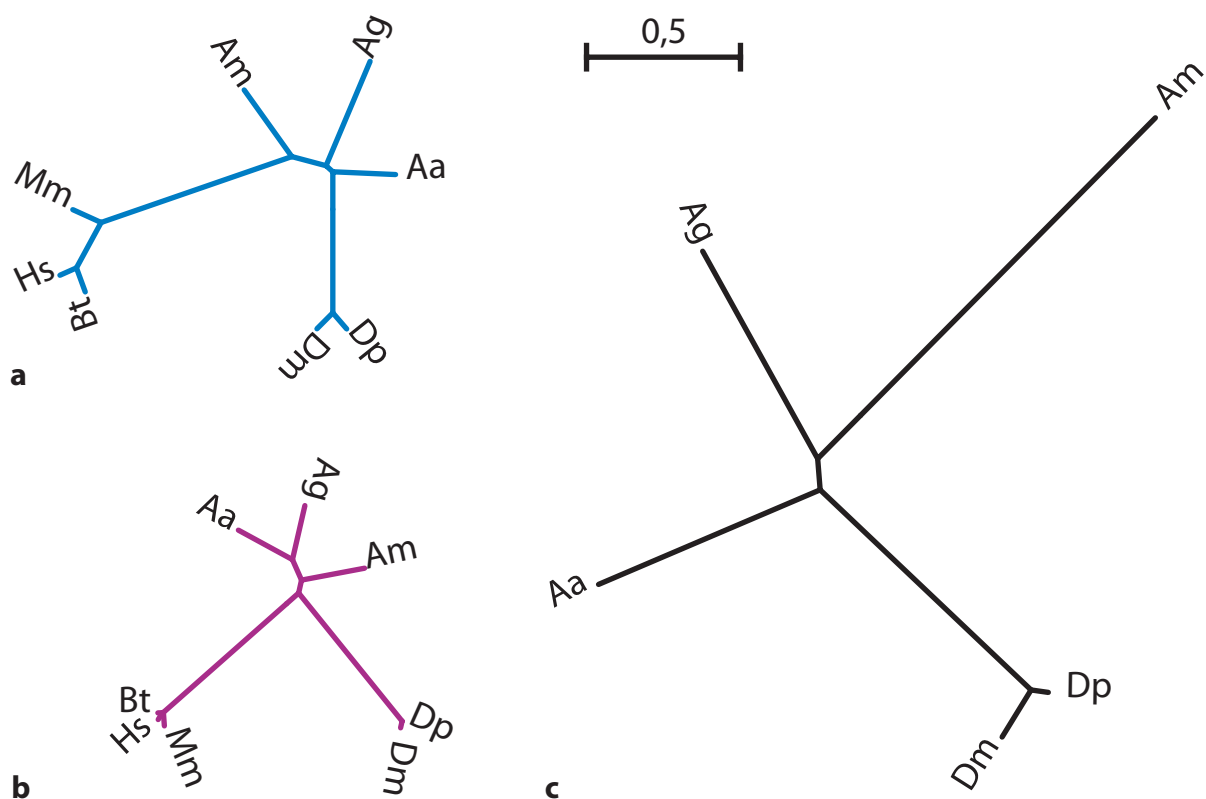


Figure I.7. Phylogrammes des domaines remarquables des protéines MyD88 de différents organismes. a. Phylogramme des domaines "Death". **b.** Phylogramme des domaines TIR. **c.** Phylogramme des domaines C-terminaux des MyD88 d'insectes.

Aa: *Aedes aegypti*, Ag: *Anopheles gambiae*, Am: *Apis mellifera*, Bt: *Bos taurus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Dp: *Drosophila pseudoobscura*, Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*.

I.2.2. Signalisation par la voie Toll

Nous souhaitons savoir si AgMyD88 est fonctionnellement substituable à DmMyD88, l'adaptateur de la voie Toll. Chez la drosophile, en présence d'un signal d'activation de la voie, par exemple une infection par le champignon *B. bassiana*, plusieurs centaines de gènes sont transcrits, et en particulier le rapporteur drosomycine (Irving *et al.*, 2001). En l'absence de *DmMyD88*, le gène codant pour ce peptide n'est pas transcrit.

Nous allons donc tester la capacité de la protéine AgMyD88 en contexte de surexpression à induire l'expression du rapporteur drosomycine, et sa capacité à remplacer DmMyD88 lorsque celle-ci est absente.

I.2.2.1. Surexpression dans le contexte sauvage

La première expérience est réalisée en présence de *DmMyD88*. Nous désirons savoir si la surexpression de *AgMyD88* chez la drosophile peut induire la production de drosomycine indépendamment de toute infection. L'expression du rapporteur drosomycine est visualisée par Northern blotting. Une infection par le champignon *B. bassiana* chez le contrôle sauvage (figure I.8.a) provoque l'induction de l'expression du transcrit *Drosomycine*. En l'absence d'infection, les drosophiles surexprimant *AgMyD88* transcrivent de manière constitutive (c'est à dire en l'absence d'une infection expérimentale) le rapporteur *Drosomycine* (figure I.8.b). Ainsi, la surexpression d'*AgMyD88* est

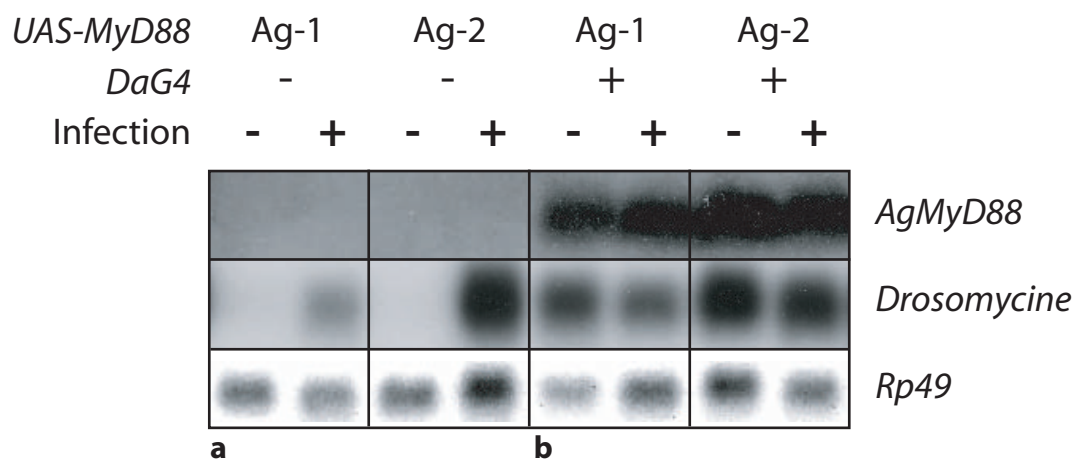


Figure I.8. Expression du transcrit *Drosomycine*, rapporteur de la voie Toll en présence du transgène permettant la surexpression de *AgMyD88*. Northern blot réalisé sur l'ARN de mouches extrait 0 (-) ou 48h (+) après infection par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. **a.** La présence du transgène sans pilote ne provoque pas l'expression d'*AgMyD88*. La drosomycine est exprimée normalement en réponse à l'infection. **b.** En présence du pilote *DaGal4* et même en l'absence d'infection, le transcrit codant pour le peptide drosomycine est exprimé à un niveau comparable à celui obtenu après une infection. On note que dans ce cas, l'expression d'*AgMyD88* est détectée, ce qui confirme la bonne expression du transgène. Sont représentés sur cette figure, les résultats obtenus avec les deux transgènes (*UAS-AgMyD88-1* et 2).

capable d'induire la transcription de la *Drosomyicine* à un niveau comparable à celui que l'on observe normalement après une infection. Les deux lignées transgéniques testées présentent le même phénotype, confirmant que l'effet observé n'est pas dû à la position du transgène. L'ARN d'*AgMyD88* est détecté ce qui permet de confirmer que celui-ci est exprimé en présence du pilote, et ce par les deux constructions transgéniques. En l'absence de pilote (figure I.8.a), la production de *Drosomyicine* est complètement normale : elle n'est pas produite en l'absence d'infection expérimentale et elle est fortement induite 48h après l'infection. L'ARN d'*AgMyD88* n'est plus détecté, confirmant que le transgène ne s'exprime seulement en présence du pilote.

Cette expérience permet donc de conclure que :

- Les mouches transgéniques *UAS-AgMyD88* sont capables d'exprimer *AgMyD88* ;
- La surexpression d'*AgMyD88* provoque l'expression constitutive du peptide drosomyicine ;
- *AgMyD88* est capable d'interagir avec la cascade de signalisation Toll de la drosophile.

I.2.2.2. Surexpression en contexte mutant pour *DmMyD88*

Pour savoir si *AgMyD88* est capable de remplacer *DmMyD88*, il faut réaliser cette expérience en l'absence de *DmMyD88*.

Les drosophiles *DmMyD88*^{-/-} infectées par le champignon *B. bassiana* perdent la capacité à exprimer le peptide drosomyicine après cette infection (figure I.9.a). En effet, l'absence de la protéine *DmMyD88* fonctionnelle empêche la transduction du signal par la voie Toll et donc l'infection expérimentale qui se traduit habituellement par l'induction de l'expression du transcrit *Drosomyicine* rapporteur de la voie n'est pas ici suivie de cet effet. Pour savoir si *AgMyD88* est capable de remplir ce rôle de transduction du signal, le transcrit correspondant a été surexprimé et l'inductibilité du rapporteur *Drosomyicine* après l'infection a été mesurée par Northern blotting. Ainsi, nous avons pu constater qu'en surexprimant *AgMyD88*, le transcrit *Drosomyicine* est de nouveau produit en réponse à l'infection (figure I.9.a). Par ailleurs, on peut noter que le transcrit de la drosomyicine est détecté en l'absence d'infection à un niveau plus élevé qu'en l'absence d'*AgMyD88*, ce qui confirme que la surexpression d'*AgMyD88* suffit à induire la voie Toll de manière signal indépendante. Ces résultats montrent que *AgMyD88* peut restaurer la capacité de produire la drosomyicine des mouches *MyD88*^{-/-}. Pour comparer les résultats obtenus avec la quantité du transcrit *Drosomyicine* habituellement produite lors d'une infection, une infection est réalisée dans les mêmes conditions mais en présence d'une copie sauvage de *DmMyD88* (figure I.9.b). Après cette infection, le transcrit *Drosomyicine* est induit, cependant à

un niveau plus élevé que dans le contexte mutant pour *DmMyD88*. Ainsi, la présence simultanée de *DmMyD88* et *AgMyD88* améliore la transmission du signal. On pourrait imaginer que les deux *MyD88* collaborent pour transmettre le signal en réponse à une infection. Ceci est corroboré par le fait qu'en l'absence d'infection, la surexpression d'*AgMyD88* provoque une induction du peptide drosomycine plus forte lorsque *DmMyD88* est présent (comparer figure I.9.a et b).

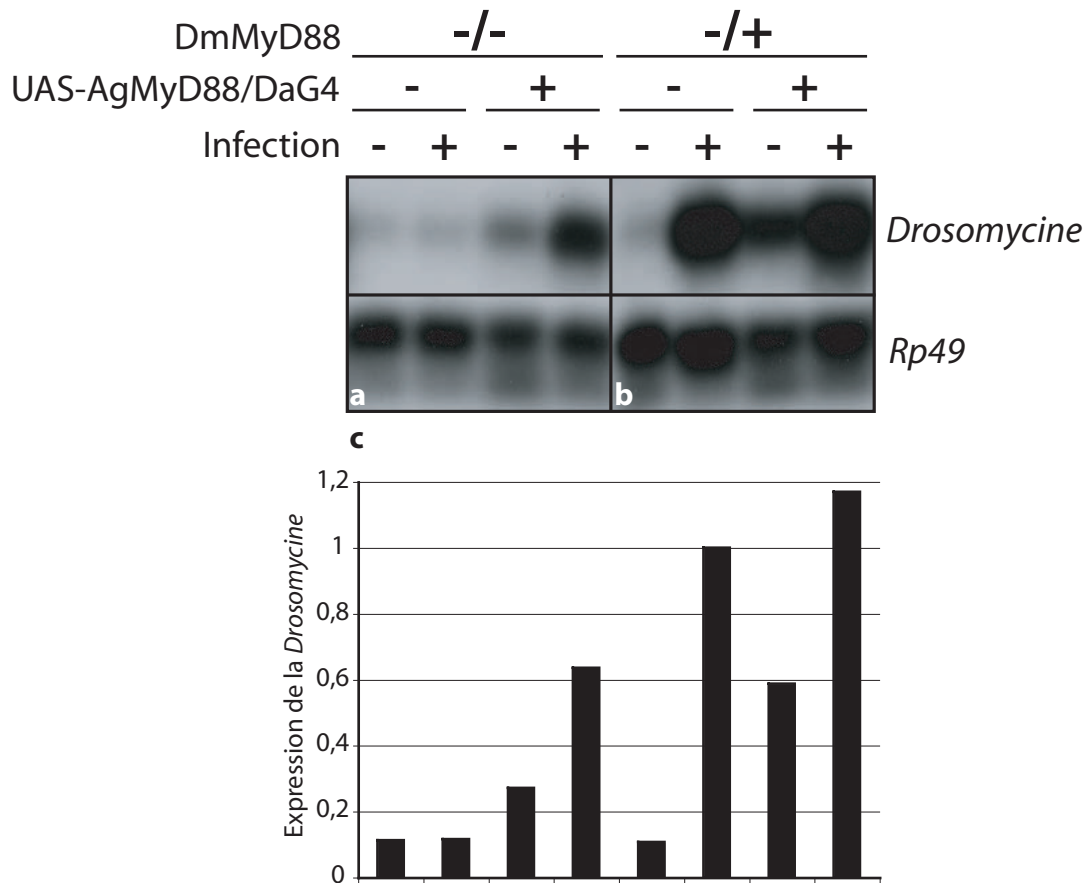


Figure I.9. Expression du peptide antimicrobien drosomycine, rapporteur de la voie Toll en contexte mutant pour *DmMyD88*. Northern blotting réalisé sur l'ARN de mouches extrait 0 (-) ou 48h (+) après infection par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. **a.** En l'absence de *MyD88* endogène, l'infection ne déclenche pas la transcription de *Drosomycine*. La surexpression d'*AgMyD88* provoque une expression spontanée de *Drosomycine* en l'absence d'infection et permet de restaurer l'expression de la *Drosomycine* après l'infection. **b.** Le contrôle en présence d'un allèle de *DmMyD88* permet de visualiser l'expression normale de la *Drosomycine* après l'infection, avec ou sans surexpression d'*AgMyD88*. Une fois encore, en l'absence d'infection, la surexpression d'*AgmyD88* permet l'induction de la *Drosomycine* sans infection. **c.** Quantification de l'expression de la *Drosomycine*, rapportée à *rp49*. L'ordre sur le graphe correspond à l'ordre des puits. La valeur 1 a été attribuée arbitrairement à l'échantillon 6, se rapprochant le plus d'un contrôle sauvage.

Cette expérience permet de conclure que :

- AgMyD88 peut suppléer à la fonction de DmMyD88 dans le contexte d'une infection ;

- L'induction de la *Drosomycine* est toutefois plus faible en l'absence de *DmMyD88*, ce avec ou sans infection. Cela laisse penser à un effet de coopération entre DmMyD88 et AgMyD88.

I.2.3. Survie après une infection

Les drosophiles mutantes pour *DmMyD88* sont très sensibles à une infection par le champignon *B. bassiana* (Tauszig-Delamasure *et al.*, 2002). Elles succombent classiquement en 3 jours (contre 8 pour des drosophiles sauvages (Rutschmann *et al.*, 2000)). Nous avons donc voulu savoir si la surexpression d'AgMyD88 pouvait favoriser la survie des drosophiles mutantes pour *DmMyD88*. Les drosophiles ont été infectées par *B. bassiana* (figure I.10). Les drosophiles *DmMyD88*^{-/-} succombent après 3 jours à l'infection. Cette mortalité est légèrement améliorée en contexte de surexpression

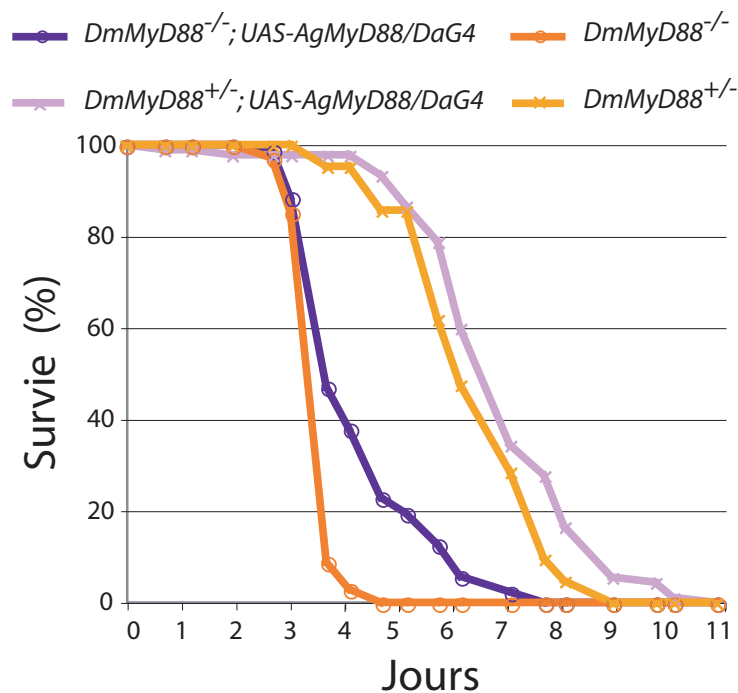


Figure I.10. Survie à une infection par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. Les drosophiles mutantes pour *DmMyD88* (ronds) surexprimant (courbe violette) ou non (courbe orange) *AgMyD88* sont infectées par *B. bassiana*. Un contrôle est effectué avec des drosophiles possédant un allèle sauvage de *MyD88* (croix). Les drosophiles *DmMyD88*^{-/-} succombent en 4 jours à l'infection contre 8 pour les drosophiles possédant un allèle sauvage *DmMyD88*. La surexpression d'AgMyD88 favorise dans les deux cas très légèrement leur survie (courbes violettes).

d'*AgMyD88* (figure I.10), mais cette amélioration ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage. Pourtant, si on surexprime *DmMyD88* en l'absence de *DmMyD88*, et qu'on réalise une infection avec le champignon *B. bassiana*, on restaure le phénotype de survie des drosophiles sauvages (Kambris *et al.*, 2003). Ainsi, le sauvetage du phénotype de survie dû à la mutation de *MyD88* est réalisé plus efficacement avec *DmMyD88* qu'avec *AgMyD88*. Enfin, nous avons surexprimé *AgMyD88* en présence d'une copie sauvage de *DmMyD88*, et nous avons pu remarquer que la présence des deux protéines prolonge légèrement le temps de survie des drosophiles après une infection par le champignon *B. bassiana* (figure I.10).

Cette expérience confirme les résultats obtenus précédemment et montre que :

- En présence de *DmMyD88*, la surexpression d'*AgMyD88* favorise légèrement la survie des drosophiles à une infection fongique ;
- En l'absence de *DmMyD88*, la surexpression d'*AgMyD88* protège légèrement les drosophiles contre l'infection fongique, mais ne restaure pas le phénotype sauvage.

I.2.4. Sauvetage du phénotype de stérilité des mouches *DmMyD88*^{-/-}

Pour compléter l'étude de sauvetage du phénotype, les embryons issus de femelles mutantes pour *DmMyD88* et surexprimant *AgMyD88* ont été observés. Les embryons issus des femelles *DmMyD88*^{-/-} ne sont pas viables, puisque la mutation provoque un dysfonctionnement de la voie Toll responsable de la formation de l'axe dorso ventral. Ces embryons ne possèdent pas les denticules caractéristiques de la partie ventrale, ils sont donc dorsalisés et non viables (figure I.11.a). En surexprimant *AgMyD88*

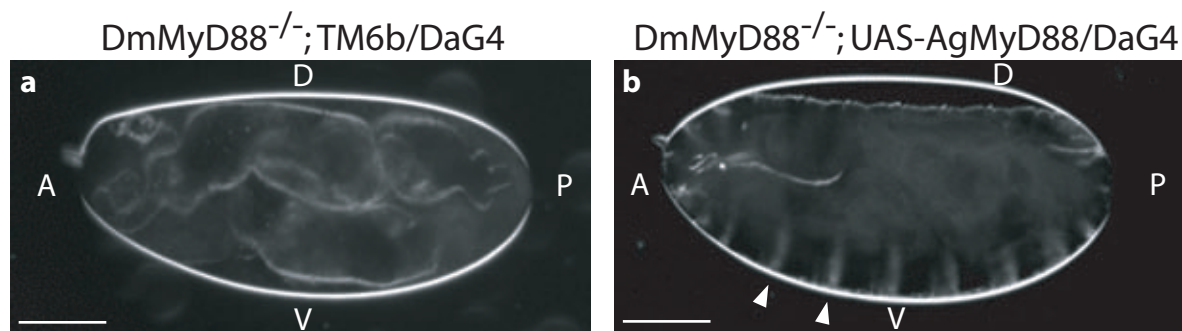


Figure I.11. Développement des embryons. a. Cuticule d'un embryon issu d'une drosophile mutante pour *DmMy88*. Il est entouré de la membrane vitelline. A: partie antérieure, P: partie postérieure, D: partie dorsale, V: partie ventrale. L'embryon ne présente pas de denticules ventrales, il est complètement dorsalisé. b. L'expression d'*AgMyD88* permet de restaurer le développement normal des embryons issus des femelles mutantes pour *DmMyD88*. Les flèches pointent les denticules caractéristiques de la partie ventrale. Barre d'échelle: 100 μ m.

avec le pilote *DaG4* dans les mouches mutantes pour *DmMyD88*, la viabilité et le développement normal des embryons issus de ces drosophiles sont restaurés, et les éléments caractéristiques des parties ventrales et dorsales sont retrouvés. Ainsi, *AgMyD88* est capable de remplacer *DmMyD88* dans son rôle développemental. Il est intéressant de noter que ceci n'est vrai que dans le cas des surexpressions fortes, en utilisant le pilote *DaGal4*. Avec le pilote *hspGal4* utilisé sans choc thermique, la restauration du phénotype sauvage n'est pas réalisée.

Cette expérience montre que :

- *AgMyD88* peut remplacer *DmMyD88* dans son rôle développemental lorsqu'il est présent en quantité suffisante.

I.3. Conclusions-discussion

En conclusion, nous avons donc pu montrer qu'AgMyD88 est un équivalent fonctionnel de DmMyD88 : il est capable de transduire un signal que ce soit après une infection ou lors du développement.

Cependant certaines différences apparaissent entre les deux protéines, au niveau de la réponse immunitaire :

- La surexpression de *AgMyD88* ne permet pas de ramener à son niveau normal la survie des drosophiles *DmMyD88*^{-/-} après l'infection par le champignon *B. bassiana*.
- La présence des deux protéines d'anophèle et de drosophile est plus efficace pour l'expression du rapporteur *Drosomycine* que la présence d'AgMyD88 seule.

Ces différences démontrent que les deux protéines MyD88 ne sont pas complètement interchangeables. Cela est particulièrement frappant dans les expériences où on utilise un « read-out » moins réducteur que l'expression d'un gène rapporteur, comme par exemple la survie à une infection. Ceci montre que les différences de structure entre les protéines MyD88 d'anophèle et de drosophile ne permettent pas à AgMyD88 de transduire le signal aussi efficacement que DmMyD88. Néanmoins, il faut rester attentif en posant ces conclusions au fait que l'on compare la réponse d'une protéine endogène à la réponse induite par une construction artificielle dans laquelle une protéine exogène est surexprimée. Beaucoup de paramètres sont ainsi modifiés par rapport à une situation physiologique, et notamment la quantité de transcrite présente. En effet, nous avons pu constater à plusieurs reprises au cours de ces expériences que l'efficacité du phénotype observé dépend du pilote utilisé pour conduire la surexpression. Nous avons utilisé le pilote *hspG4*, sans choc thermique, en profitant du fait que le promoteur est fuyant. Ceci entraîne une expression modérée du transgène, ce qui n'est pas le cas du pilote *DaG4* qui provoque une surexpression forte. Pour illustrer ce point, on peut rappeler que la surexpression de *DmMyD88* avec le pilote *hspG4* sans choc thermique dans les drosophiles *DmMyD88*^{-/-} ne permet pas d'induire une expression constitutive de *Drosomycine*, mais suffit à sauver le phénotype de sensibilité au champignon *B. bassiana* et à restaurer l'expression de la *Drosomycine* après l'infection (Kambris *et al.*, 2003). Dans les mêmes conditions, après activation du promoteur *hsp* par choc thermique, le transcrite *Drosomycine* est détecté en l'absence de toute infection (Jean Luc Imler, communication personnelle). Lorsque nous avons utilisé le pilote *hspG4* sans choc thermique pour surexprimer *AgMyD88* (ces données n'ont pas été présentées ici), nous n'avons pas réussi à sauver le phénotype mutant *DmMyD88*^{-/-}, le seul effet de l'expression de *AgMyD88* sous le contrôle de *hspG4* a été d'améliorer légèrement la survie à l'infection par *B. bassiana*. C'est donc seulement la surexpression forte d'AgMyD88 qui a permis de restaurer le phénotype *DmMyD88*^{-/-} pour l'expression de la drosomycine après l'infection et le développement embryonnaire. Ceci montre que la quantité de protéine exogène

AgMyD88 nécessaire pour restaurer le phénotype *DmMyD88*^{-/-} est plus importante que la quantité de protéine endogène DmMyD88 nécessaire pour cette même fonction. Il faut donc garder à l'esprit que les résultats obtenus ici le sont avec des quantités de protéine probablement non physiologiques. Les conclusions obtenues avec ce type d'expériences sont donc toujours à considérer avec prudence, surtout lorsque comme ici, on s'intéresse à des différences assez fines entre deux protéines orthologues.

Ceci posé, les différences observées entre les protéines MyD88 d'anophèle et de drosophile avec ces expériences de sauvetage présentent un intérêt certain pour essayer de mieux comprendre comment fonctionne cette famille de protéines. Quelles sont les explications possibles des observations que nous avons réalisées ?

Les alignements des protéines MyD88 réalisés ont permis de montrer que les domaines « Death » et TIR sont très conservés même entre les protéines de mammifères et d'insectes. Ces alignements ont permis de mettre en évidence l'existence d'une extension C-terminale de 150 paires de bases spécifique des protéines MyD88 d'insectes. Cette extrémité C-terminale est très peu conservée suggérant que la pression de sélection ne s'est pas appliquée aussi fortement que sur les domaines conservés « Death » et TIR. Par ailleurs, la protéine MyD88 de drosophile possède une extension N-terminale de 60 aa qui est absente des protéines MyD88 des autres espèces. Notons aussi que le domaine intermédiaire (ID) entre le domaine TIR et le domaine « Death » est assez peu conservé, or il a été démontré chez les mammifères que ce domaine intermédiaire a un rôle fonctionnel (Janssens *et al.*, 2002) notamment pour le recrutement de IRAK-4. Les différences que nous avons observées entre les fonctionnalités des deux protéines AgMyD88 et DmMyD88 tiennent donc peut-être aux fonctions de ces extrémités N- et C-terminales et du domaine intermédiaire dans la transduction du signal. L'absence de l'extrémité C-terminale chez les mammifères laisse présager un rôle particulier de celle-ci chez les insectes. Pour valider cette hypothèse, on pourrait imaginer un certain nombre d'expériences relativement simples de construction de protéines chimères où l'on intervertirait les extrémités C-terminales de la protéine d'anophèle de drosophile. Ces expériences pourraient dans un premier temps être conduites en lignées cellulaires, puis étendues *in vivo* afin de compléter le travail présenté ici. Elles permettraient de vérifier si l'extrémité C-terminale des protéines MyD88 a effectivement un rôle dans la transduction du signal.

Les différences entre les deux protéines AgMyD88 et DmMyD88 sont aussi à replacer dans le contexte moléculaire de chacune. Chez la drosophile, DmMyD88 interagit avec Toll et Tube, et aurait pour rôle de maintenir Tube à la membrane, même en absence de signal (Sun *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2004). Or chez l'anophèle, il n'existe pas d'homologue de Tube (voir le chapitre II), ce qui induit forcément un fonctionnement différent du complexe Toll-MyD88-Tube dans la transduction du signal.

Les expériences de sauvetage mettent aussi en lumière une différence entre le sauvetage développemental qui est complet et le sauvetage immunitaire qui est partiel. Cela suggère que au niveau du complexe récepteur, la transduction du signal n'est pas la même pour le fonctionnement de la voie Toll dans le développement ou dans l'immunité. Plus précisément, les données obtenues semblent même indiquer que le signal qui est transduit par la voie Toll lors du développement serait plus « simple » (du type tout ou rien, dorsalisation/pas dorsalisation) que le signal transduit lors d'une réponse immunitaire (ce qui est logique si l'on considère qu'une réponse immunitaire est de fait une réponse à des stimuli variables, qui nécessitent donc un traitement particulier). Que sait-on des différences dans l'utilisation de la voie Toll chez l'embryon et chez l'adulte ? Pour la partie intracellulaire de la voie (celle qui nous intéresse), ces différences se résument à l'utilisation de deux facteurs de transcription de type NF- κ B différents. Le facteur Dorsal est utilisé dans les processus de développement chez l'embryon et le facteur Dif est requis pour l'immunité chez les adultes (il est à noter qu'il a été démontré que chez les larves, Dorsal et Dif peuvent induire la transcription des peptides antimicrobiens (Manfrulli *et al.*, 1999)). Ainsi au niveau intracellulaire, le complexe récepteur utilisé serait rigoureusement le même. Néanmoins, d'autres données que celles que nous venons d'obtenir laissent entendre que le fonctionnement du complexe récepteur dans l'immunité et le développement serait différent. Par exemple, il existe plusieurs allèles mutants de *DmMyD88*. Certains présentent un phénotype immunitaire très fort mais pas de phénotype développemental. C'est le cas de l'allèle qui a été utilisé pour démontrer le rôle de *DmMyD88* dans l'immunité (Kambris *et al.*, 2003). Cet allèle possédant une mutation en amont de l'ATG, on peut envisager qu'une faible quantité de protéine est encore traduite. Par contre, l'allèle qui entraîne la traduction d'une protéine privée d'extrémité C-terminale empêche à la fois la transduction du signal dans l'immunité et dans le développement. Ceci s'intègre bien aux résultats obtenus ici qui tendent à démontrer qu'il est plus facile de restaurer la fonctionnalité de la cascade Toll dans le développement de l'embryon que pendant la réponse immunitaire chez l'adulte. On pourrait imaginer que le complexe récepteur diffère, ce qui commence d'être étayé par des données obtenues au laboratoire dans l'équipe de Jean Luc Imler en collaboration avec Jui-Chou Hsu, de la National Tsing Hua University à Taïwan. En effet, il a été démontré (J.L. Imler, communication personnelle) qu'un adaptateur à doigts de zinc appelé Weckle est capable d'interagir avec *DmMyD88* et Toll. L'absence de cet adaptateur provoque le phénotype caractéristique des mutants de la voie Toll avec une dorsalisation des embryons déposés par les femelles. Weckle est donc un des éléments du complexe récepteur Toll utilisé au cours du développement. Les expériences réalisées pour tester le rôle éventuel de Weckle dans la réponse immunitaire n'ont pas permis de montrer qu'il est impliqué (J.L. Imler, communication personnelle). Ces données suggèrent que le complexe récepteur utilisé lors du développement impliquerait l'adaptateur Weckle, ce qui ne serait pas le cas du complexe récepteur utilisé lors de la réponse immunitaire.

Ainsi, le modèle où MyD88 est l'interactant unique de Toll via son domaine TIR et de Tube via son domaine « Death » est dépassé. Les données obtenues ces dernières années chez les mammifères (O'Neill, 2006) montrent aussi que la situation est très complexe : on connaît aujourd'hui 5 adaptateurs des Toll Like Receptors (MyD88, Tirap, Tram, Trif et Sarm). Ces 5 adaptateurs agissent comme des cofacteurs ou permettent l'activation de différentes voies de signalisation, dans des fenêtres de temps variées. On imagine aujourd'hui que la multiplicité de ces adaptateurs traduit différentes fonctions soit de localisation membranaire, soit de transduction du signal. Ainsi, TIRAP aurait pour rôle de localiser MyD88 dans certaines zones de la membrane et MyD88 assurerait la transduction du signal. De manière parallèle, Tram localiserait Trif dans d'autres zones et Trif assurerait la transduction du signal (R. Medzhitov, Keystone NF- κ B meeting, mars 2006, (O'Neill, 2006)). Par ailleurs, il a été démontré que certains des adaptateurs activent directement des facteurs de transcription (Takaoka *et al.*, 2005). C'est donc bien une plateforme complexe d'adaptateurs qui au niveau du récepteur permet l'activation d'une voie donnée. Si on revient à la drosophile, ces données font écho aux données obtenues principalement *in vitro*, qui démontrent que dans le cas du développement, au niveau du complexe récepteur Toll se trouvent non seulement Tube, Pelle, mais aussi Dorsal et Cactus (Edwards *et al.*, 1997). Ainsi, on retrouve ce qui a été évoqué chez les mammifères, à savoir une interaction directe au niveau du complexe récepteur avec le facteur de transcription. Et ceci pourrait aussi expliquer la différence entre la signalisation chez l'embryon et chez l'adulte puisque les facteurs de transcription sont différents (Dorsal et Dif). Ces données rejoignent les questions soulevées plus haut au sujet de la fonction de l'extrémité C-terminale qui a certainement un rôle dans la modulation des signaux, le recrutement d'autres partenaires... Tous ces éléments permettent de construire un nouveau schéma pour le fonctionnement de la voie Toll (figure I.12), et éclairent aussi les résultats obtenus lors de la comparaison fonctionnelle que nous avons réalisée. Pour mieux comprendre ce complexe récepteur il serait utile d'étudier vraiment en détail le rôle des extrémités non conservées N et C-terminales de MyD88. Ces études pourraient être conduites en utilisant les nombreuses possibilités qu'offre l'existence des protéines MyD88 d'anophèle et de drosophile.

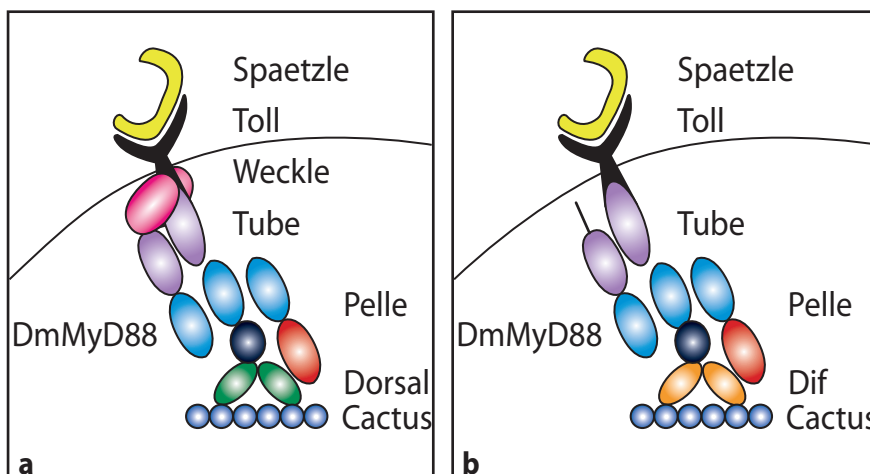


Figure I.12. Le complexe récepteur de la voie Toll de la drosophile.

a. Chez l'embryon.
b. Chez l'adulte.

Chapitre II

A la recherche de la voie Toll chez l'anophèle

La conservation fonctionnelle de MyD88 entre l'anophèle et la drosophile laisse ouverte la possibilité d'une conservation fonctionnelle de la voie Toll chez l'anophèle. Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu étudier chez l'anophèle les homologues des molécules intervenant dans cette voie de signalisation de la drosophile. Au début de ce travail, peu de choses étaient connues sur les voies de signalisation impliquées dans la régulation du système immunitaire de l'anophèle. Il faut noter aussi que très peu de choses étaient connues sur le système immunitaire de l'anophèle lui-même, et en particulier les techniques d'investigation qui avaient donné de nombreux résultats chez la drosophile n'avaient pas été tentées chez l'anophèle.

La dissection du système immunitaire de la drosophile a pu être réalisée grâce à la découverte des peptides antimicrobiens (revu dans Boman et Hultmark, 1987; Hultmark, 1993). Ces peptides avaient été découverts au préalable chez le lépidoptère *Hyalophora cecropia* (revu dans Boman, 1991). Ces peptides à activité antimicrobienne synthétisés rapidement après une infection se sont avérés être d'excellents rapporteurs de l'infection chez la drosophile. Ainsi, en observant les défauts d'induction de ces peptides chez certains mutants, les voies responsables de leur synthèse ont pu être identifiées (Lemaitre *et al.*, 1995; Lemaitre *et al.*, 1996). C'est ainsi qu'une grande partie des composants des voies Toll et Imd ont pu être caractérisés. Par ailleurs, la réalisation de tests de survie après l'infection par différents pathogènes a été utilisée chez la drosophile, au départ principalement pour confirmer les résultats d'expression des peptides, c'est à dire vérifier que l'absence du peptide rapporteur est corrélée à un défaut du système immunitaire (Lemaitre *et al.*, 1995; Lemaitre *et al.*, 1996). Ces deux techniques d'investigation, expression des peptides visualisée par Northern blotting et expériences de survie, couplées à des mutagénèses ont permis d'arriver à la vision que l'on a aujourd'hui du système immunitaire de la drosophile (revu dans Hoffmann, 2003). Il est donc tentant de procéder de façon similaire, d'autant que le modèle anophèle offre la possibilité d'invalider spécifiquement un gène par l'injection d'un ARN double brin correspondant chez les adultes (Blandin *et al.*, 2002). Notre but étant de progresser rapidement grâce aux connaissances acquises chez la drosophile, nous allons tester l'importance de gènes candidats à l'aide des deux « read-out » préalablement utilisés chez la drosophile: expression des peptides antimicrobiens et survie. Pour choisir les gènes testés, nous allons réaliser une étude comparative entre les éléments

du système immunitaire de la drosophile et les homologues existant chez l'anophèle.

Chez *A. gambiae*, plusieurs peptides antimicrobiens ont été identifiés. En 1996, Richman et ses collaborateurs (Richman *et al.*, 1996) ont identifié par chromatographie liquide en phase inverse (« reverse phase HPLC ») une défensine induite chez les larves après une infection par un mélange de deux bactéries, *E. coli* et *S. aureus*. Par la suite, Vizioli *et al.* (Vizioli *et al.*, 2001b) ont poursuivi sa caractérisation et pu montrer qu'elle est induite après une infection chez l'adulte. Elle est active dans les tests *in vitro* contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*), certaines bactéries à Gram négatif (certaines souches de *E. coli* par exemple) et certains champignons. En 2002, il a été démontré grâce à des expériences de survie chez des moustiques où le gène codant pour la défensine a été invalidé par ARN interférence que ce peptide est important pour la résistance aux infections par la bactérie *S. aureus* (Blandin *et al.*, 2002).

En 2000, une cécropine (Cecropine A) a été identifiée par homologie, (Vizioli *et al.*, 2000) grâce à un crible par PCR sur une banque d'ADNc d'*A. gambiae*. Chez l'adulte, l'expression de son transcrite est induite 4 fois par la piqûre d'un mélange d'*E. coli* et *S. aureus*. Elle est active contre les bactéries à Gram négatif (*E. coli*), certaines bactéries à Gram positif et certains champignons. A la suite de la publication du génome, deux autres cécropines ont été identifiées, B et C (Zheng et Zheng, 2002). Les trois cécropines sont organisées en cluster, elles ont été renommées Cécropine 1 pour la Cécropine A, Cécropine 2 pour la Cécropine C, Cécropine 3 pour la Cécropine B.

En 2001, un nouveau peptide, la gambicine, a été identifié à partir de lignées cellulaires d'*A. gambiae*, par crible d'activité antimicrobienne de fractions de chromatographie en phase inverse, et par « differential display » PCR (Vizioli *et al.*, 2001a). La gambicine est active contre les bactéries à Gram positif et négatif, elle a pour particularité structurale de posséder 4 ponts disulfure. Depuis, elle a aussi été identifiée chez d'autres espèces de moustiques comme *Culex pipiens* (Bartholomay *et al.*, 2003).

Ainsi, 5 peptides antimicrobiens sont connus chez l'anophèle. Le séquençage du génome n'a pas révélé la présence évidente d'autres peptides antimicrobiens conservés entre la drosophile et l'anophèle (Christophides *et al.*, 2002). Au début de cette étude, rien n'était connu sur les modes de régulation de ces peptides, mais on savait que la défensine et la cécropine 1 étaient induites après une infection bactérienne chez les adultes. Notre but au début de ce travail a été de clarifier les conditions d'induction des peptides antimicrobiens d'anophèle (infections par des bactéries à Gram positif ou négatif et par des champignons). Chez la drosophile, la voie Toll est impliquée dans la régulation de l'expression de certains peptides antimicrobiens (drosomycine (Lemaitre *et al.*, 1996), metchnikowine (Levashina *et al.*,

1998), défensine (Rutschmann *et al.*, 2002)) ou dans la défense contre les infections par des bactéries à Gram positif (Rutschmann *et al.*, 2002) ou des champignons (Lemaitre *et al.*, 1996). Nous avons voulu savoir si ces fonctions étaient conservées chez l'anophèle. Nous avons donc recherché les éléments intracellulaires conservés de cette voie et analysé leurs séquences, à partir des premières analyses du génome de l'anophèle (Christophides *et al.*, 2002). Par la suite, nous avons examiné *in vivo* le rôle des homologues des composants de la voie Toll dans l'induction des peptides antimicrobiens de l'anophèle, afin de déterminer les similitudes qui existeraient avec la régulation des peptides antimicrobiens chez la drosophile. Puis nous avons examiné le rôle de ces mêmes molécules dans la survie des anophèles aux infections fongiques ou bactériennes.

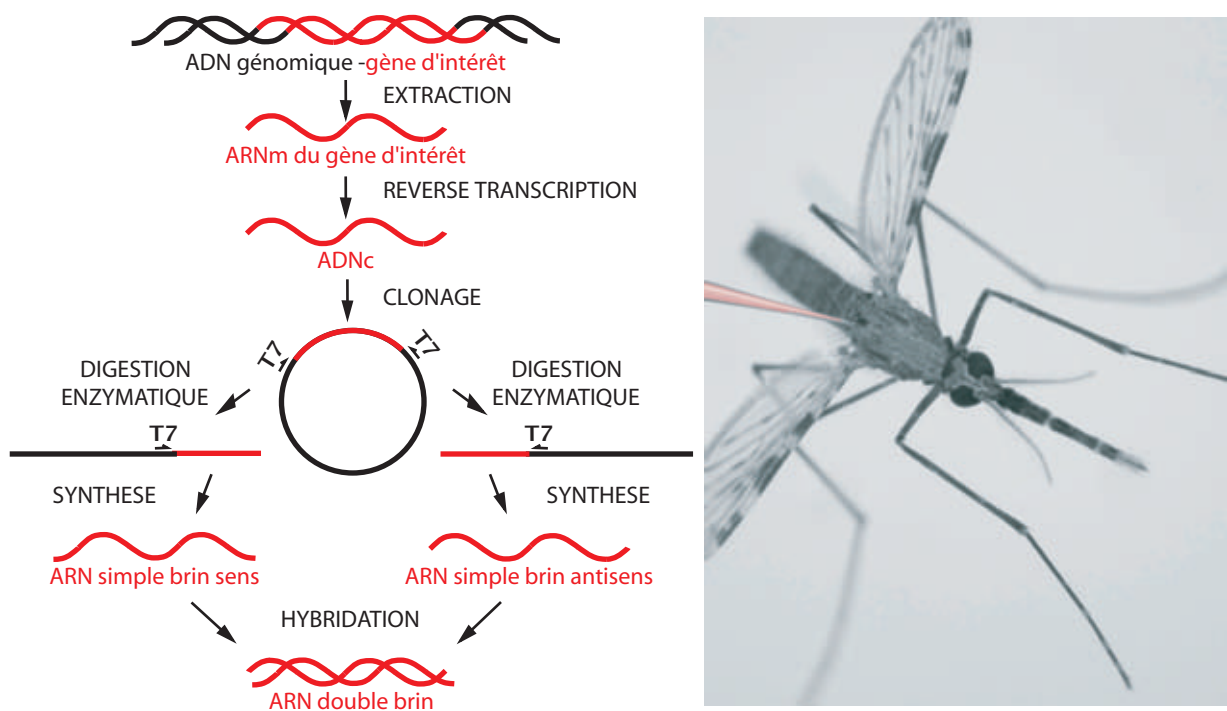


Figure II.1. Technique utilisée pour invalider les gènes chez *A. gambiae*. Les ARN simple brin sont synthétisés à partir d'une région de 500 paires de bases de l'ADNc du gène d'intérêt. Ils sont ensuite hybridés chacun à la concentration de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, puis injectés à l'arrière du thorax d'une femelle d'*A. gambiae* âgée d'un jour.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Analyse bioinformatique

Pour analyser les protéines prédites d' *A. gambiae*, nous avons réalisé des recherches de domaines remarquables à l'aide du programme CD-search (Marchler-Bauer and Bryant, 2004).

Les alignements de séquence ont été réalisés à l'aide du logiciel ClustalX (voir le chapitre I).

II.1.2. Infections

Les anophèles femelles sont infectées par le champignon *B. bassiana* (souche 80.2) ou *M. anisopliae* (souche ARSEF 23) en déplaçant délicatement les insectes sur une culture sporulente (voir le paragraphe II.2.1).

Les infections par des bactéries sont réalisées avec des cultures bactériennes en croissance exponentielle. La bactérie à Gram négatif utilisée est *E. coli* (souche OP-50, exprimant la GFP, résistante à l'ampicilline), la bactérie à Gram positif est *S. aureus* (souche résistante à la Tétracycline (Moita *et al.*, 2005)). La densité optique des bactéries est mesurée à 600 nm (DO_{600}) et elles sont utilisées en croissance exponentielle, quand la DO_{600} de la culture atteint 0,3. Avant d'être injectées, les bactéries sont lavées deux fois dans du PBS autoclavé et filtré puis resuspendues à la concentration voulue (calculée par rapport à la DO_{600}). L'injection de 69 nL de bactéries est réalisée sur le côté du thorax avec un Nanoject II (Drummond).

Pour les expériences de survie, les moustiques sont gardés dans un incubateur à 29°C et 75% d'humidité. Ils sont nourris de cotons imprégnés de sucre à 10%, changés tous les deux jours. Les morts sont comptés et retirés des pots deux fois par jour. La survie est poursuivie jusqu'à la mort de l'ensemble des moustiques.

II.1.3. Invalidation des gènes par ARN interférence

Chez l'anophèle, il est possible d'invalider de manière efficace un gène par ARN interférence (Blandin *et al.*, 2002). Cette ARN interférence est réalisée par une injection d'ARN double brin dans le thorax du moustique (figure II.1). Pour chaque gène à invalider, un fragment de 500 à 700 paires de bases de l'ADNc est choisi, puis cloné dans un vecteur possédant deux promoteurs T7 qui permettent de transcrire ce fragment dans les deux sens. Les deux ARN simple brin ainsi produits sont alors quantifiés et hybridés pour obtenir un ARN double brin final à 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 0,2 μg d'ARN double brin sont ensuite

injectés à l'arrière du thorax des anophèles à l'aide d'un injecteur Nanoject II (Drummond).

II.1.4. Northern blotting

Une quinzaine de moustiques sont broyés dans le TRIzol® pour chaque point expérimental puis les ARN sont extraits et quantifiés. 20 µg des ARN sont déposés pour chaque point expérimental sur un gel d'agarose à 1%. Le gel est transféré par capillarité sur une membrane de nylon qui est successivement hybridée avec les sondes marquées radioactivement.

Les sondes sont fabriquées à l'aide du kit Rediprime à partir d'ADNc spécifique du gène à marquer. Nous avons construit une banque d'ADNc dans le système Gateway (Invitrogen), permettant des clonages simplifiés et accélérés, à partir d'intestins et de tubes de malpighi (qui portent tous les deux à leur surface des hémocytes) de moustiques sains, infectés par *P. berghei* ou piqués par des bactéries (*E. coli* et *S. aureus*) (S. Wyder, B. Setterblad, P. Wincker, K. Eiglmeier, S.M. Gomez, B. Segurens, C. Kappler, S.-H. Shiao, N. Baldeck, C. Frolet, N. Ibrahim, J.A. Hoffmann, J. Weissenbach, P.T. Brey, V. Schachter, E.A. Levashina, C.W. Roth. *Anopheles gambiae* full-length cDNA libraries: genome annotation and comparative analysis from development to immunity, en préparation). Le but était d'enrichir la banque finale en gènes spécifiques de l'immunité. De fait, la banque dont 40000 clones ont été séquencés par le Génoscope à Evry contient 900 nouveaux transcrits. Le séquençage de cette banque nous permet de retrouver rapidement les clones d'intérêt pour les clonages ultérieurs. Pour préparer les ADNc, nous avons donc généralement utilisé les clones existants de cette banque. Ces clones ont été coupés par deux enzymes de restriction afin de générer un fragment d'environ 300 paires de bases. Quand aucun clone n'est disponible, une PCR est réalisée puis le produit est inséré dans le vecteur pGEMTeasy (Promega) qui est ensuite digéré par deux enzymes permettant d'extraire l'insert. La sonde *S7*, spécifique du gène *S7* codant pour la protéine ribosomale *S7* (Salazar *et al.*, 1993) est utilisée comme témoin de dépôt des échantillons.

- *Cécropine 1* : Coupure EcoRI de pLL135 (pGEMTeasy dans lequel est inséré le fragment amplifié par PCR avec les oligomères AG46 5'-TCCTGCAGCAAACATCTTATCA-3' et AG475'-TTTTATCACTTTTCCCCTCCCT-3')

- *Cécropine 2* : Coupure SmaI/NotI du clone de la banque 13AE05 (pLL 179)

- *Cécropine 3* : Coupure SmaI/NotI du clone de la banque 1DB05 (pLL 180)

- *Défensine* : Coupure SmaI/NotI du clone de la banque 53DD03 (pLL 181)

- *Gambicine* : Coupure EcoRI de pLL130 (pGEMTeasy dans lequel est inséré le fragment amplifié avec les oligomères 5'-AACCGGAAGGGCGTTTCGTG-

3' et 5'-CGTCTGGCACTGATTAAACC-3')

- S7 : (ENSANGT00000016949) Coupure SmaI/NotI du clone de la banque 16DB01 (pLL 182)

II.1.5. Microscopie à balayage

Les cultures sporulentes de *B. bassiana* sont observées après avoir été métallisées par pulvérisation cathodique de 450 Å d'or. Elles ont aussi été observées en microscopie environnementale sans traitement.

Les abdomens de moustiques sont disséqués à température ambiante puis fixés une heure dans 2,5% glutaraldéhyde (à partir de là toutes les étapes sont réalisées sur la glace), et lavés dans le PBS. La déshydratation commence dans 50% d'éthanol pendant 15 minutes, puis 70% d'éthanol (de 15 min. à plusieurs jours si nécessaire) et se termine par 10 min. dans l'éthanol à 95% et 3 fois 5 min. dans l'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite trempés 2 fois 30 s. dans du diméthylsilazane et fixés sur le support. Ils sont enfin métallisés par pulvérisation cathodique de 450 angström d'or.

Les expériences de microscopie à balayage ont été réalisées à la plateforme de microscopie du CEPE (Centre d'Ecologie et de Physiologie Energétiques), à Strasbourg.

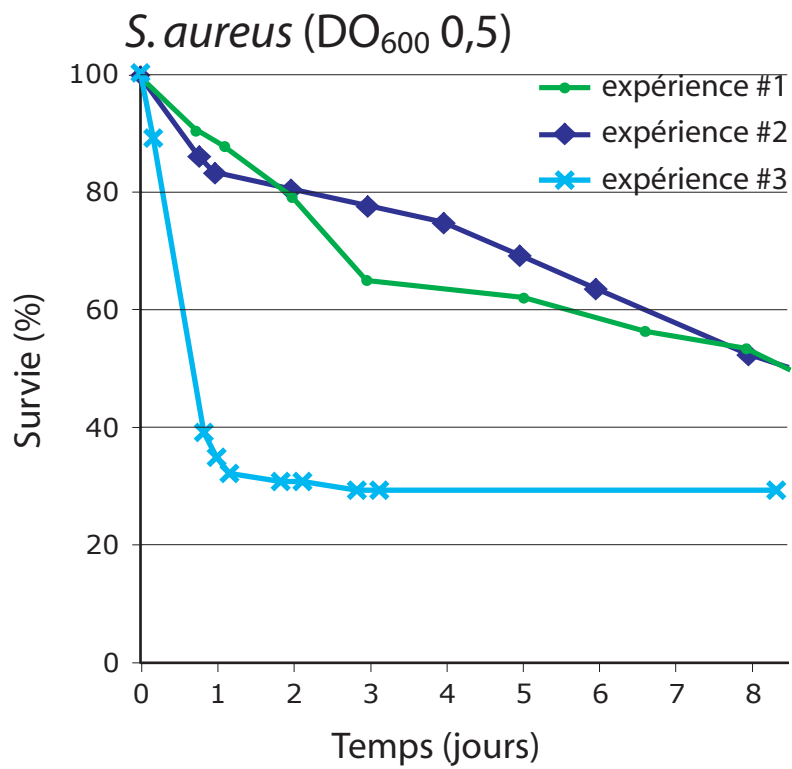


Figure II.2. Survie des anophèles après une infection avec la bactérie *S. aureus*. 3 expériences indépendantes sont montrées, toutes réalisées dans les mêmes conditions, avec la même souche de *S. aureus*, à la DO₆₀₀ de 0,5.

II.2. Résultats

II.2.1. Mise au point des conditions d'infection et expériences de survie

En premier lieu il a fallu mettre au point les infections. Ces infections doivent nous permettre de suivre dans le temps un certain nombre de paramètres (survie, expression de gènes...). L'idéal est de disposer d'un microorganisme capable de tuer les anophèles sauvages à partir d'une certaine dose. En effet, cela permet de tester si il est possible de ralentir ou d'accélérer la mort des moustiques et de réaliser des expériences en présence de quantités sublétales de microorganisme. Si le microorganisme est très peu virulent et ne tue pas (même à de fortes concentrations), il sera plus difficile de tirer des conclusions.

Nous avons choisi comme bactéries à Gram négatif *E. coli*, connue pour tuer très rapidement les drosophiles dont le système immunitaire est déficient. Cette bactérie a déjà été utilisée chez l'anophèle (Blandin *et al.*, 2002) et nous avons repris les mêmes conditions expérimentales. Cette bactérie ne tue ni les drosophiles sauvages, ni les anophèles sauvages. Cependant à de très fortes concentrations, les anophèles peuvent succomber. Comme bactérie à Gram positif, nous avons choisi *Staphylococcus aureus* qui tue les drosophiles dont le système immunitaire est déficient en 2 jours à une DO_{600} de 0,1 (Vincent Bischoff, communication personnelle), et qui tue aussi les anophèles à partir d'une certaine dose ($DO_{600}=5$) (Blandin *et al.*, 2002). Enfin, nous avons utilisé deux champignons, *Beauveria bassiana* et *Metharizhium anisopliae*, qui tuent tous les deux les drosophiles sauvages (en respectivement 8 et 6 jours environ). Au début de cette étude, aucun test de survie n'avait été encore réalisé avec des champignons sur des anophèles.

II.2.1.1. Survie des anophèles aux infections bactériennes

Pour réaliser les expériences de survie avec les bactéries, nous sommes partis des données déjà existantes (Blandin *et al.*, 2002). Nous avons rapidement constaté une grande variabilité des courbes de survie d'une expérience à l'autre avec la même concentration de bactéries. Par exemple, la bactérie *S. aureus* a donné des résultats extrêmement difficiles à reproduire, puisque dans certains cas, elle tuait les moustiques très rapidement (mais jamais complètement) à une DO_{600} de 0,5 (figure II.2), voire même à une DO_{600} de 0,005 alors que dans d'autres elle ne tuait pas. Nous n'avons pas réussi à établir une courbe dose-réponse qui soit cohérente avec cette bactérie. Cela tient sans doute au fait que ces études ont été réalisées pendant l'établissement de notre élevage de moustiques et peuvent représenter la variabilité des conditions d'élevage (température, humidité) et donc de santé des moustiques

à cette époque. Il serait aussi sans doute judicieux de tester d'autres souches de *S. aureus*. Pour *E. coli*, nous avons aussi observé une certaine variabilité des résultats, cependant, aux concentrations que nous avons utilisées (allant jusqu'à $DO_{600}=0,5$), l'injection de la bactérie ne provoque jamais une létalité supérieure à 30%.

II.2.1.2. Survie des anophèles à l'infection fongique naturelle

Suite au manque de reproductibilité des données obtenues avec les infections bactériennes, nous avons tenté de développer des infections fongiques, un modèle qui n'avait pas encore été utilisé pour ce genre d'études chez les moustiques. Nous avons choisi de nous intéresser au champignon entomopathogène *B. bassiana*, afin de mettre au point ce modèle d'infection. Ce champignon est couramment utilisé dans notre laboratoire pour infecter les drosophiles. Les mouches sauvages succombent classiquement en 8 jours après une infection (réalisée en les secouant sur une culture sporulente) (Rutschmann *et al.*, 2000).

Nous avons essayé de travailler de la même façon avec les anophèles. Il se sont révélés plus fragiles que les drosophiles et le fait de les secouer de la même manière sur une boîte de culture leur fait perdre les pattes ce qui les empêche par la suite de se nourrir et accélère leur mort. Les résultats ne reflétaient donc pas l'effet de l'infection fongique. Nous avons donc établi un protocole dans lequel les moustiques sont délicatement déplacés sur la boîte de

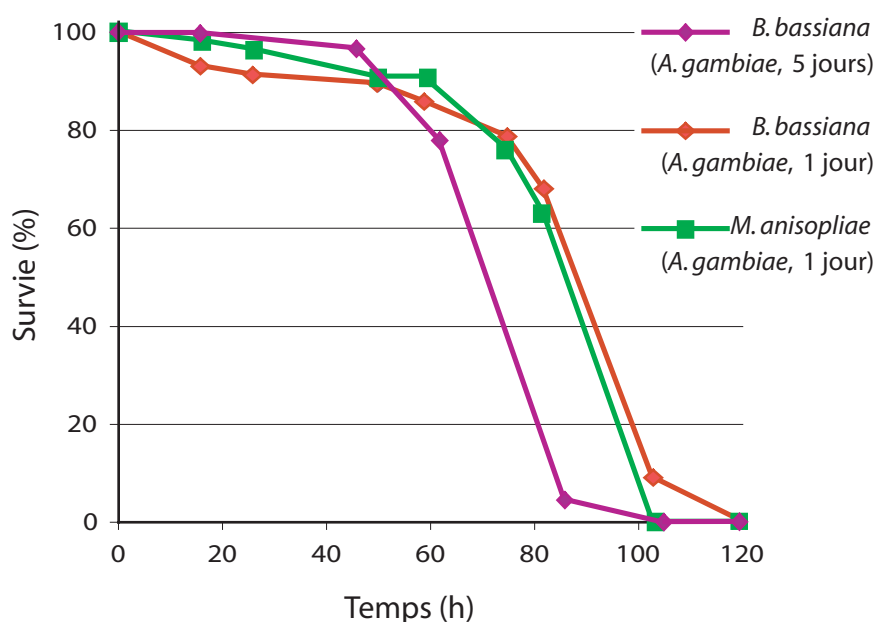


Figure II.3. L'effet de l'âge sur la survie des anophèles après aux infections fongiques. Les anophèles sont infectées à différents âges sur une culture sporulente de *B. bassiana* (losanges) ou *M. anisopliae* (carrés). On peut noter que la résistance des anophèles diminue avec leur âge. Une expérience représentative.

de culture sporulente. Ce protocole a donné des résultats très reproductibles où les anophèles âgés de 1 jour succombent en 4 jours (figure II.3.).

La survie des anophèles à cette infection décroît avec leur âge, puisque lorsqu'ils sont âgés de 5 jours, ils succombent plus rapidement, en un peu plus de 3 jours. On peut remarquer que si on réalise cette expérience en parallèle des infections bactériennes, l'espérance de vie des anophèles est beaucoup plus courte, ce qui rend l'expérience plus aisée à utiliser et interpréter (figure II.4.)

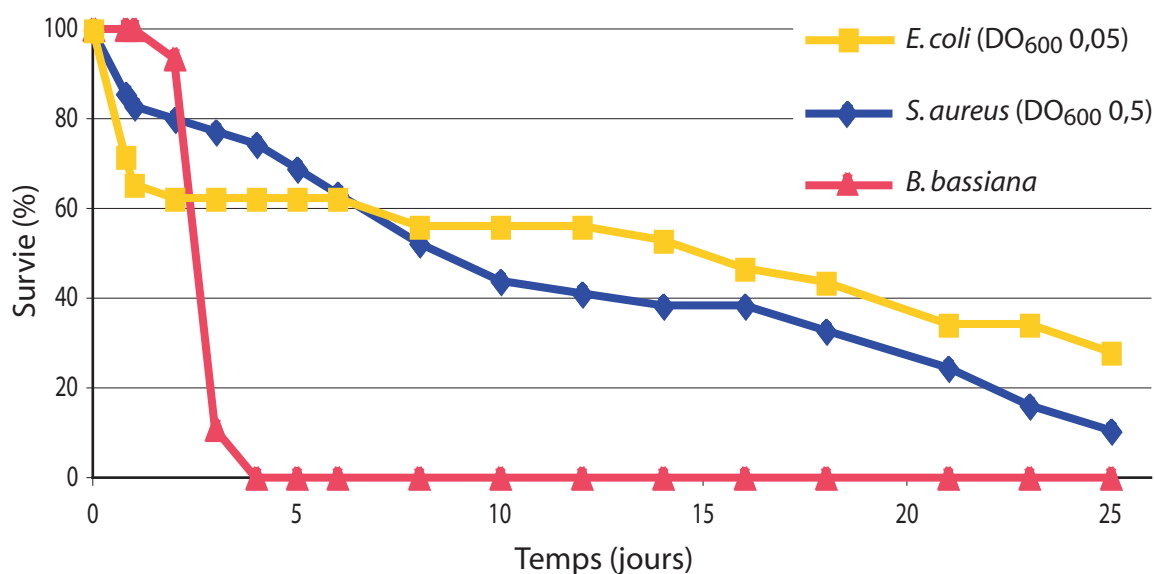


Figure II.4. Survie des anophèles à différentes infections. Des d'anophèles de 5 jours ont été infectées par *E. coli*, *S. aureus* ou *B. bassiana* (une cinquantaine de femelles par point). Elles avaient au préalable été injectées par l'ARN double brin contrôle *dsLacZ*. 1 expérience.

Nous avons testé le même protocole sur une autre espèce de champignon, *M. anisopliae* et pu observer que la survie des anophèles à cette infection était similaire (figure II.3).

Nous avons voulu savoir si l'on pouvait mettre en évidence la progression des champignons à l'intérieur de l'anophèle par microscopie à balayage, afin de s'assurer que la progression de l'infection fongique est bien responsable de la mort des moustiques. Nous avons tout d'abord observé des cultures sporulentes de *B. bassiana* (figure II.5) afin d'avoir une idée de la taille et de la morphologie précise du champignon que nous utilisons. Par la suite, nous avons réalisé une infection fongique puis analysé par la même technique de microscopie à balayage l'intérieur des abdomens disséqués afin de voir si nous pouvions détecter des hyphes ou des spores. Nous avons pu remarquer dans les moustiques infectés après 48 h un certain nombre de structures qui semblent étrangères, sur les muscles, mais relativement petites par rapport à ce qu'on attendrait du champignon (figure II.6). De telles images ne sont pas retrouvées chez les moustiques non infectés, mais, ne disposant pas

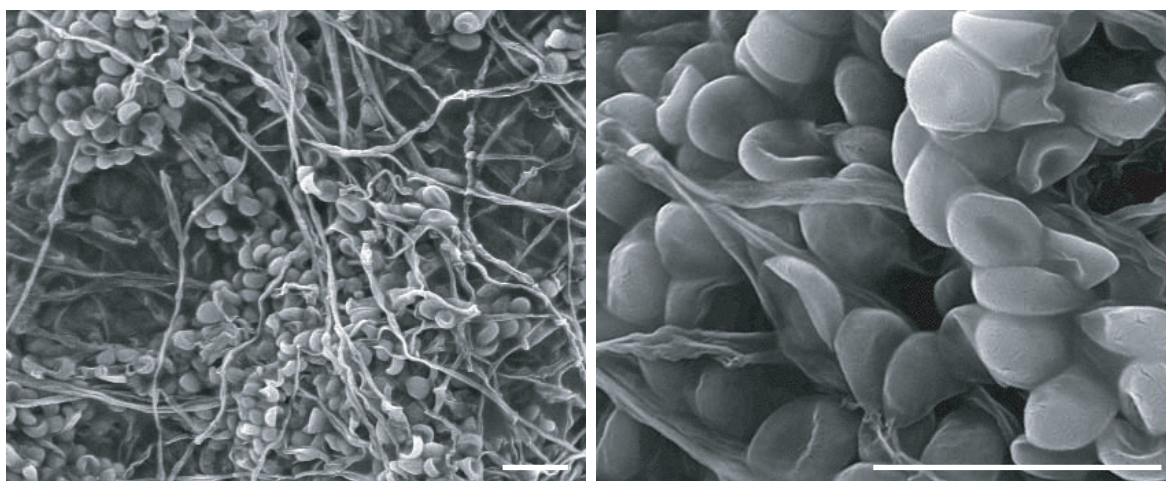


Figure II. 5. Culture sproulente de *B. bassiana* observée au microscope à balayage après métallisation. Barre d'échelle 5 μ m.

de marqueurs spécifiques du champignon, nous n'avons pas pu identifier de quoi il s'agissait. Nous n'avons jamais pu non plus mettre en évidence la croissance de *B. bassiana* sur les moustiques infectés après leur mort.

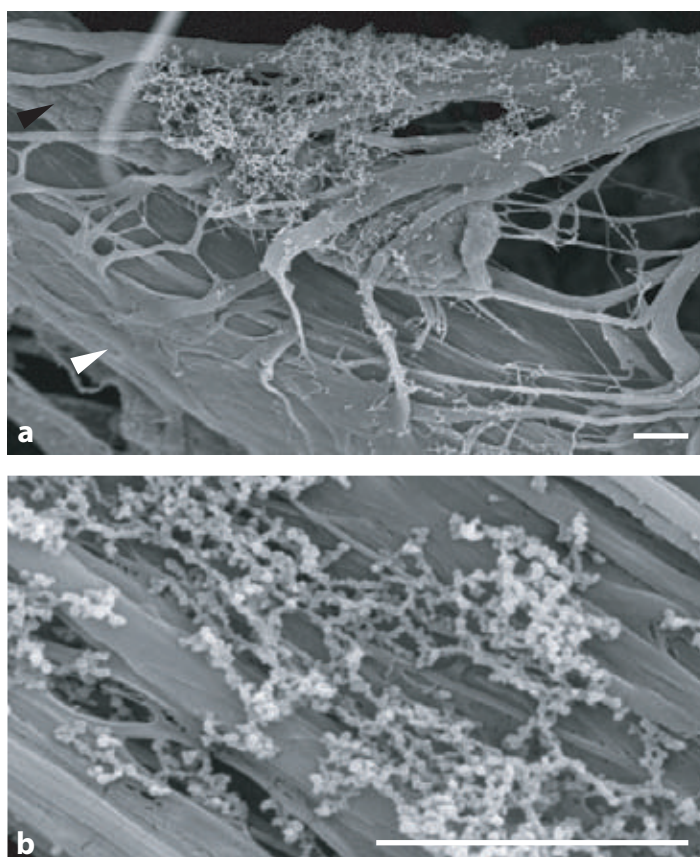


Figure II.6. Moustiques infectés par *B. Bassiana*. Deux exemples de vues de l'intérieur de l'abdomen 48 h après l'infection. **a.** Une cellule péricardiale (flèche noire) longeant le vaisseau dorsal (flèche blanche). Les muscles enserrant cette cellule péricardiale sont recouverts d'une structure filamenteuse. **b.** Cette structure filamenteuse est retrouvée à d'autres endroits en particulier sur les muscles. Echelle 5 μ m.

II.2.2. Régulation de l'expression des peptides antimicrobiens d'*A. gambiae* après différents types d'infections

Nous cherchons à connaître le patron d'expression des peptides antimicrobiens en réponse à une infection chez l'anophèle adulte. Pour cela nous allons procéder comme cela a été fait chez la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1997). Les moustiques seront infectés par différents types de microorganismes et l'induction de l'expression des peptides antimicrobiens sera mesurée au niveau transcriptionnel par Northern blotting.

Nous avons utilisé trois microorganismes: une bactérie à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, une bactérie à Gram négatif, *Escherichia coli*, et un champignon, *Beauveria bassiana*. Les infections ont été suivies dans le temps.

II.2.2.1. Expression des peptides antimicrobiens suite à une infection bactérienne

Les anophèles sont injectées séparément avec *E. coli* (DO₆₀₀ 0,05) ou *S. aureus* (DO₆₀₀ 0,05) et l'expression des peptides antimicrobiens est suivie 30 minutes, 1, 3, 6, 12, 24 et 48 heures après l'infection (figure II.7). Les peptides antimicrobiens (Cécropines 1, 2, 3 et Défensine) sont transcrits fortement et facilement détectables par Northern blotting en l'absence d'infection ou après une piqûre propre. Après l'infection, le niveau de transcription est toujours fort et la détection des peptides est facile. Du fait de la forte transcription

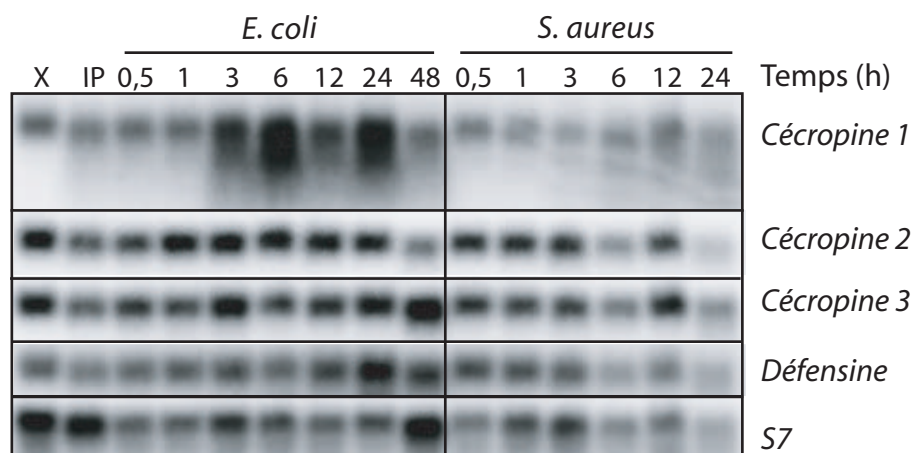
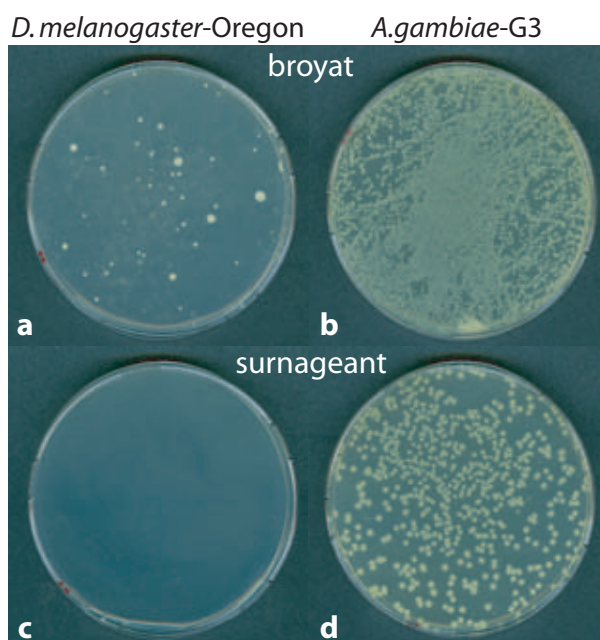


Figure II.7. Expression des peptides antimicrobiens après une infection bactérienne. Les anophèles sont injectées avec 69nL d'une suspension bactérienne lavée, en phase de croissance exponentielle (DO 0,05). X: non injectées, IP: anophèles collectées 3h après une injection propre. Le northern blot a été successivement hybridé avec des sondes spécifiques des peptides antimicrobiens et du contrôle de dépôt S7.

basale des peptides, il est difficile par la technique du Northern blotting de visualiser une induction des peptides consécutive à l'infection. Cependant, on peut noter que le transcrite de la *Cécropine 1* semble être spécifiquement induit par la bactérie *E. coli*.

Le fait que les peptides antimicrobiens soient fortement exprimés en l'absence d'une infection expérimentale chez l'anophèle a été observé à chaque fois que ce type d'expérience a été conduit, ce qui semble donc être une spécificité des anophèles, tout au moins dans nos conditions d'élevage. L'organisme modèle drosophile ne présente pas ce type de profil. Si on regarde de manière similaire les peptides antimicrobiens de la drosophile, ils sont généralement indétectables en l'absence d'une infection expérimentale. Pour expliquer cette observation, on peut imaginer que du fait des différences entre les modes de vie de l'anophèle et de la drosophile, l'hémocoèle du moustique ne soit pas stérile contrairement à celle de la drosophile. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons broyé des drosophiles ou des anophèles puis étalé ce broyat sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB. Nous avons constaté que les drosophiles sont des insectes quasiment stériles mais que les anophèles sont très riches en bactéries (figure II.8). Cette observation est confortée par le fait que nous observons régulièrement des bactéries en circulation à l'intérieur de l'hémocoèle des moustiques. La présence continue des peptides antimicrobiens a peut-être un rôle dans le maintien de ces colonies bactériennes à un niveau raisonnable pour la survie de l'anophèle.

Figure II.8. Contamination bactérienne des anophèles et des drosophiles en l'absence d'infection expérimentale. 5 femelles ont été broyées dans 200µL de PBS autoclavé et filtré. 100µL de ce broyat sont étalés sur une boîte de pétri contenant du milieu LB (a et b). Les 100µL restant ont été centrifugés à 2000G et le surnageant étalé sur une boîte de pétri contenant du milieu LB (c et d). Les boîtes sont laissées 2h à 37°C.



II.2.2.2. Expression des peptides antimicrobiens suite à une infection fongique

Nous avons réalisé le même type d'expérience après une infection fongique. Au moment de l'infection par le champignon *B. bassiana*, tous les moustiques avaient entre 5 et 6 jours. L'analyse de l'expression des peptides antimicrobiens 0, 24, 48 et 72 heures après l'infection montre que tous ces peptides sont fortement exprimés en l'absence d'une infection (sauf peut être la cécropine 1 qui est plus faiblement détectée) (figure II.9). Ainsi nous confirmons les résultats obtenus précédemment lors des infections par les bactéries, montrant qu'en l'absence de toute infection, les transcrits des gènes codant pour les peptides antimicrobiens de l'anophèle sont détectés.

Les autres expériences réalisées sur le Northern blot présenté sur la figure II.9 sont des injections d'ARN double brin dirigés contre des gènes qui n'appartiennent pas à l'anophèle. Ces gènes sont *LacZ*, le gène codant pour la β -galactosidase et *GFP* codant pour la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). Ces deux ARN double brin ont été utilisés comme contrôle par la suite et le but était ici de vérifier que leur injection ne modifie pas les résultats de l'expérience, comparé à des moustiques non injectés (à gauche de la figure). On remarque que ces deux expériences contrôle réalisées en parallèle donnent exactement le même résultat que l'expérience sans injection (figure II.9).

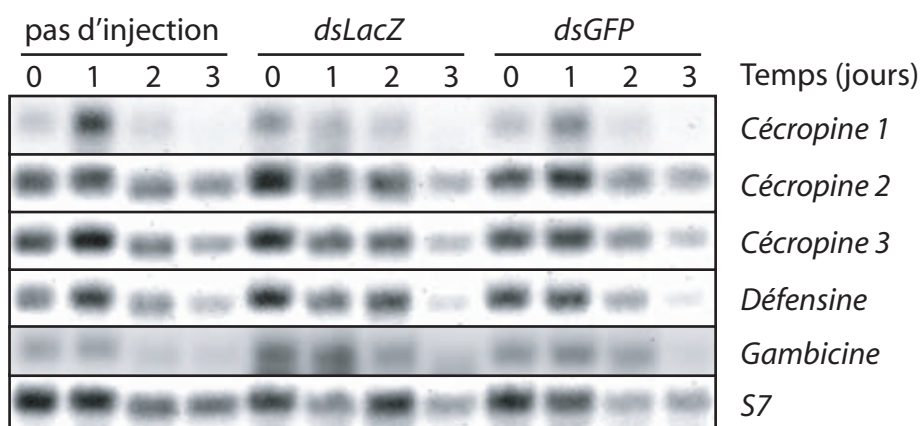


Figure II.9. Expression des peptides antimicrobiens suite à une infection par le champignon *B. bassiana*. Les anophèles sont âgés de 5 jours au moment de l'infection et certaines ont été injectées préalablement par un ARN double brin servant de contrôle, *dsLacZ* ou *dsGFP*. Les ARN des anophèles sont extraits 0, 1, 2 ou 3 jours après l'infection. La membrane est successivement hybridée par les sondes spécifiques des différents peptides antimicrobiens de l'anophèle et du contrôle de dépôt S7 (le gène S7 code pour une protéine ribosomale).

La technique du Northern blotting n'est sans doute pas adaptée pour quantifier de si petites différences d'induction des peptides antimicrobiens (si elles existent). Il faudrait maintenant réaliser ces expériences en PCR quantitative en temps réel pour étudier de façon plus précise les régulations

éventuelles suite aux infections expérimentales. En effet, vu le taux de transcription basal des peptides, on n'observe pas une réponse de type tout ou rien mais sans doute une induction fine des peptides qui si elle existe ne sera visualisable que par une technique plus sensible.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience de PCR quantitative sur les ADNc d'anophèles infectées par *B. bassiana* ou *M. anisopliae*, 0, 1, 2 ou 3 jours après l'infection. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois pour le moment et constitue donc un résultat préliminaire. Néanmoins, nous observons que le transcrite codant pour le peptide Défensine n'est pas induit après l'infection fongique. Le transcrite codant pour la Cécropine 3 est induit trois fois 2 jours après l'infection par le champignon *M. anisopliae*, mais pas après l'infection par *B. bassiana* (figure II.10). Cette expérience préliminaire indique que l'on n'observe pas chez l'anophèle d'induction des gènes codant pour les peptides antimicrobiens semblable à celle que l'on observe chez la drosophile (avec couramment une induction de plus de 50 fois des transcrits des peptides dans les mêmes conditions expérimentales). Nous ne pouvons donc a priori pas utiliser les peptides antimicrobiens comme marqueurs de l'infection. Nous avons donc voulu voir si d'autres gènes pouvaient servir de marqueurs de l'infection et nous avons choisi de tester le gène *TEP1* (qui code pour une protéine de type facteur du complément, ThioEster containing Protein 1, impliquée dans l'opsonisation et la phagocytose des bactéries (Levashina *et al.*, 2001)) et le gène *LRIM1* (Leucine Rich repeat IMMune gene 1, impliqué dans la phagocytose d'*E. coli* (Moita *et al.*, 2005)). Ces deux gènes impliqués dans la réponse immunitaire contre les bactéries sont induits trois fois, 24 h après les deux infections fongiques que nous avons testées (figure II.10). Ces gènes seront donc peut être de meilleurs marqueurs de l'infection fongique que les peptides antimicrobiens, car ils sont induits par les deux types de champignons que nous avons testés. Ces expériences restent à confirmer et la question de savoir pourquoi ils sont induits et quel est leur rôle éventuel dans la réponse contre cette infection est posée.

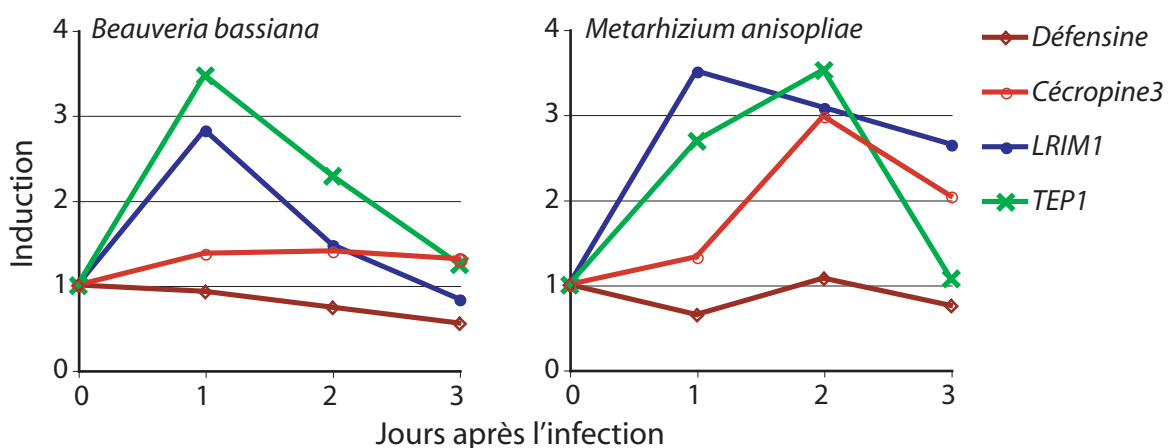


Figure II. 10. Induction de gènes après l'infection par les champignons *B. bassiana* et *M. anisopliae*. L'induction des transcrits des peptides antimicrobiens Défensine et Cécropine3 et des protéines TEP1 et LRIM1 a été mesurée par PCR quantitative en temps réel 0, 1, 2 ou 3 jours après l'infection naturelle.

II.2.3. Analyse bioinformatique

Comme nous l'avons signalé en introduction et dans le chapitre I, les molécules agissant en amont de la voie Toll chez la drosophile sont relativement peu conservées chez l'anophèle. En effet, si on prend l'exemple de la cytokine spaetzle qui se lie au récepteur Toll de la drosophile, on en retrouve 6 homologues chez l'anophèle. Cela rend l'étude de cette partie de la voie assez ardue et c'est pour cela que nous avons commencé notre travail par l'étude des homologues des composants connus de la partie intracellulaire de la voie Toll. Par ailleurs, ces composants étant des passages obligés de la voie, leur étude doit suffire dans un premier temps pour comprendre le rôle éventuel de cette cascade chez l'anophèle.

Lors de la publication du génome de l'anophèle, cette étude a été conduite. Ont été reportés:

- Un orthologue de MyD88 (AgMyD88, ENSANGT00000015749) qui a été largement étudié au chapitre I.
- Un homologue de Tube (ENSANGT00000032399)
- Un homologue de Pelle (ENSANGT00000010886)
- Un orthologue de Cactus (ENSANGT00000010014)
- Un homologue de Dorsal (ENSANGT00000011101 identifié précédemment et appelé Gambif1 (Barillas-Mury *et al.*, 1996), il a depuis été renommé Rel1)

II.2.3.1. Tube

Comme la plupart des éléments de la voie Toll, la protéine Tube de drosophile (DmTube) a été identifiée en premier lieu pour son rôle dans le développement (Nüsslein-Volhard, 1979). Les embryons issus des drosophiles mutantes pour *Tube* présentent un phénotype dorsalisé (comme les embryons issus des drosophiles *MyD88*^{-/-}, voir le chapitre I). Par la suite, il a été démontré (Lemaitre *et al.*, 1996) que Tube est aussi impliquée dans l'induction de la drosomycine après une infection, et que les mutants *Tub*^{-/-} sont sensibles à une infection fongique. DmTube est une protéine de 462 aa qui comporte un domaine "Death" en N-terminal (SMART00005) (aa 27 à 152). Ce domaine lui permet d'interagir avec MyD88 et avec Pelle (Galindo *et al.*, 1995). Pour ce qui est de l'homologue prédit de Tube chez *A. gambiae*, il fait 350 aa. Une analyse des domaines fonctionnels de cette protéine ne montre aucun domaine "Death". Au contraire, un domaine kinase (SMART00220) occupe la quasi totalité de la protéine (des aa 99 à 277). Une analyse par BLAST montre que l'un des plus proches homologues de cette protéine est la protéine IRAK4 (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4) de l'homme, avec 39% d'identité. La protéine prédite pour être l'homologue de DmTube chez *A. gambiae* n'est donc pas un homologue de DmTube. La question se pose alors de savoir si la protéine DmTube a un homologue chez l'anophèle.

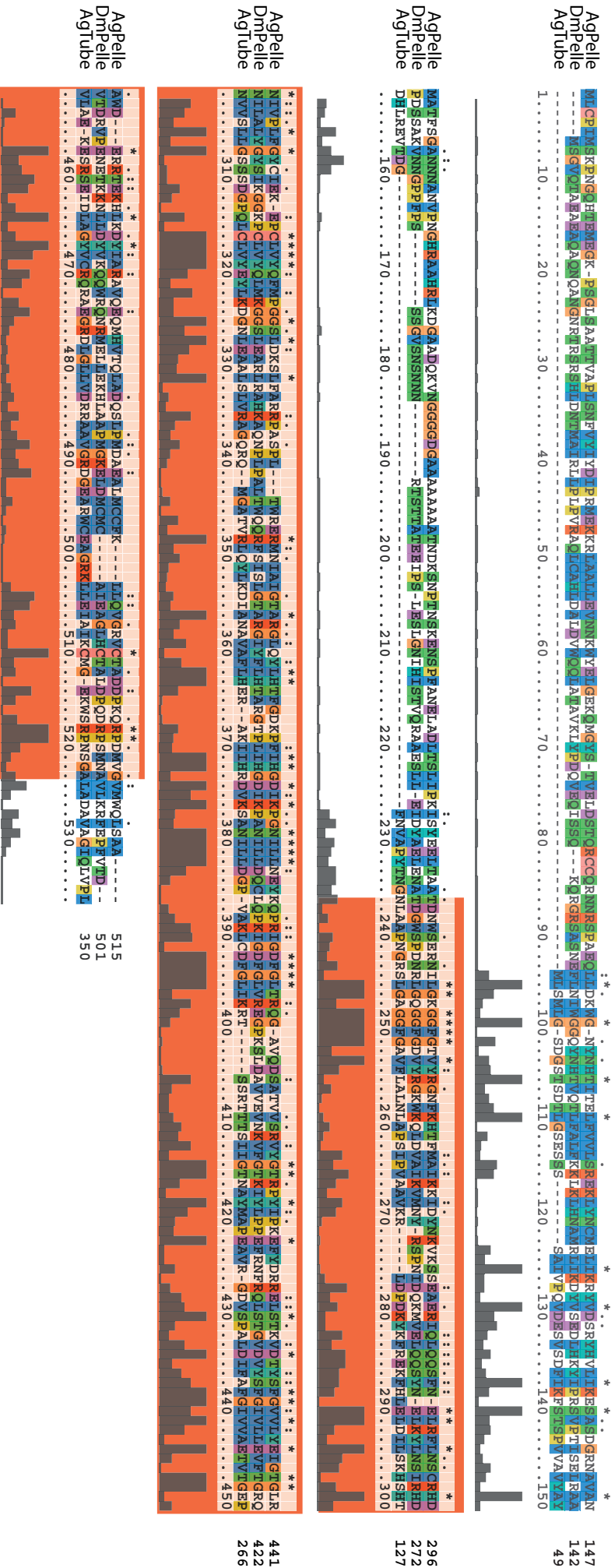


Figure II.12. Alignement réalisé par ClustalX des protéines Tube et Pelle prédites pour *A. gambiae* avec la protéine Pelle de *Drosophila*. En rouge le domaine kinase.

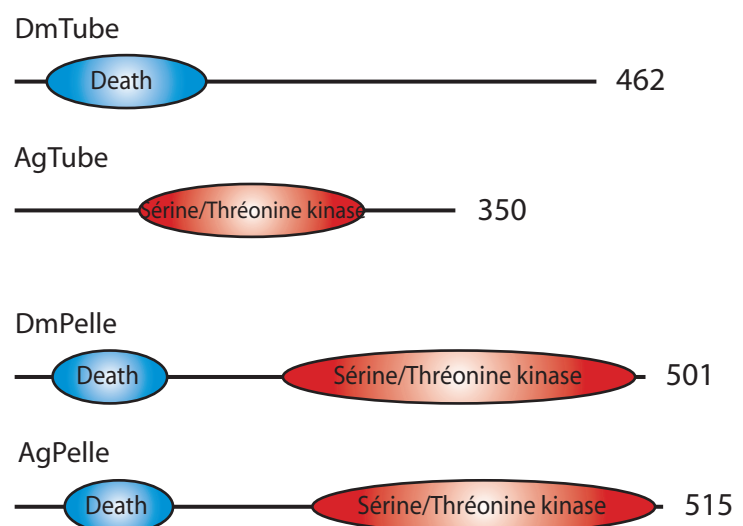
Une recherche par BLASTP à partir de la séquence de DmTube montre que l'anophèle ne possède aucune molécule qui ressemble à Tube. D'ailleurs, il est intéressant de constater que cette recherche par BLASTP ne donne des résultats que chez des espèces de drosophiles. Les génomes des autres insectes séquencés semblent dépourvus d'un équivalent de Tube.

II.2.3.2. Pelle

De même que Tube, Pelle a été identifiée chez la drosophile pour son rôle dans le développement (Nüsslein-Volhard, 1979). Elle appartient au même groupe phénotypique que Toll, Tube et Dorsal, et son absence entraîne une stérilité des femelles due à un défaut de polarité dorso-ventrale des embryons. Chez l'adulte, son absence entraîne une sensibilité accrue des drosophiles aux infections fongiques et une diminution de l'inductibilité du gène codant pour la drosomycine après l'infection. DmPelle est une protéine de 501 acides aminés possédant un domaine "Death" (SMART00005) (aa 30 à 121) et un domaine de type sérine/thréonine kinase (SMART 00220) (aa 213 à 493) (figure II.11). La découverte du rôle de cette protéine dans la voie Toll a permis d'identifier un homologue chez les mammifères, impliqué dans la voie des TLR (Cao *et al.*, 1996). Cette famille de protéines est maintenant appelée IRAK (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase). L'homologue prédit chez l'anophèle (AgPelle) fait 515 aa et présente les mêmes domaines: un domaine "Death" (SMART00005) entre les aa 40 et 126 et un domaine de type sérine/thréonine kinase (SMART00220) entre les aa 236 et 509 (figure II.11). Si on réalise une analyse par BLASTP, la protéine d'anophèle et celle de drosophile sont extrêmement proches avec près de 40% d'identité sur la totalité de leur séquence (figure II.12). Ainsi, on a bien un homologue de Pelle chez *A. gambiae*. Il est intéressant de remarquer que la séquence annotée au départ comme Tube chez *A. gambiae*, présente de grandes similarités avec la partie C-Terminale (le domaine kinase) de cette protéine Pelle (figure II.11). Il y a ainsi chez l'anophèle deux protéines de type IRAK.

Figure II.11. Comparaison des domaines remarquables des protéines Tube et Pelle d'anophèle et de drosophile.

On observe une forte conservation de structure entre les deux protéines Pelle où l'on retrouve un domaine "Death" et un domaine Kinase. Cela n'est pas le cas des protéines Tube, ce qui démontre une erreur de prédiction lors de l'annotation du génome.



II.2.3.3. Cactus

Cactus est un facteur de type $I\kappa B$, identifié pour son rôle dans le développement chez la drosophile (Roth *et al.*, 1991). A la différence des autres gènes découverts dans ce crible, les embryons déposés par les femelles mutantes pour *cactus* sont complètement ventralisés. Il a été proposé par la suite que Cactus retient dans le cytoplasme un facteur de type NF- κB , Dorsal (Kidd, 1992), capable de transcrire des gènes spécifiant la ventralisation. Si Cactus est inactivé, alors Dorsal est transloqué dans le noyau de manière signal indépendante et pour tout l'embryon qui est alors complètement ventralisé. Cactus joue aussi un rôle dans l'immunité puisqu'il est capable de retenir le facteur de transcription de type NF- κB Dif (Tatei and Levine, 1995) dans le cytoplasme, ce qui provoque en son absence l'expression constitutive du peptide antimicrobien Drosomycine (Lemaitre *et al.*, 1996).

Cactus est une protéine de 500 acides aminés chez la drosophile et présente six répétitions de type ankyrine entre les résidus 224 et 450. Les répétitions ankyrine sont des éléments caractéristiques des protéines $I\kappa B$ permettant leurs interactions avec les protéines de type NF- κB (revu dans (Mosavi *et al.*, 2004)). La protéine prédite chez l'anophèle fait 389 acides aminés et présente elle aussi 6 répétitions de type ankyrine entre les résidus 134 et 343. Sur ce domaine à répétitions ankyrines, le degré d'identité entre les deux protéines est de plus de 50%. Ainsi DmCactus a un orthologue chez l'anophèle.

II.2.3.4. Rel1

Enfin, le facteur de type NF- κB ressemblant le plus aux facteurs Dif et Dorsal de la voie Toll présent chez l'anophèle, est le facteur Gambif1 (que l'on appellera par la suite Rel1) identifié en 1996 (Barillas-Mury *et al.*, 1996). Il a été cloné grâce à des oligomères dégénérés correspondants aux domaines RHD (Rel Homology Domain) de facteurs NF- κB . Du point de vue de sa séquence, ce facteur est plus proche de la protéine Dorsal que de Dif. Il est intéressant de noter que suite à la publication du génome, aucun autre facteur de type Dif/Dorsal n'a été trouvé. Un autre facteur de type NF- κB a été identifié, Rel2, très proche de Relish qui intervient dans la voie Imd. Ainsi, la duplication de Dif et Dorsal serait postérieure à la séparation des deux espèces anophèle et drosophile, ou bien l'anophèle aurait perdu Dif. On n'a donc qu'un seul facteur de transcription chez l'anophèle, là où la drosophile en utilise deux, l'un plus particulièrement dédié au développement (Dorsal) et l'autre à l'immunité des adultes (Dif). Il a été démontré que Rel1 est produit dans le corps gras des anophèles adultes et qu'il est transloqué vers le noyau après une piqûre avec un mélange de *E. coli* et *M. luteus* (Barillas-Mury *et al.*, 1996). Dorsal est une protéine de 678 aa et Rel1 possède 696 aa. Elles présentent toutes deux les mêmes domaines (RHD (Rel Homology Domain) (pfam00554) et IPT/TIG (Immunoglobulin-like fold, Plexins, Transcription factors / Transcription factor

ImmunoGlobin) (pfam01833)) en N-Terminal, caractéristiques des facteurs de transcription de type NF- κ B. La structure tridimensionnelle de la liaison de Rel1 à l'ADN a été publiée en 1999 (Cramer *et al.*, 1999), montrant que la partie N-terminale a de fortes ressemblances de structure avec les protéines NF- κ B de mammifères (p50, p52, p65), mais que cependant l'interaction avec l'ADN présente des spécificités de positionnement.

Ainsi, nous avons chez l'anophèle deux orthologues de composants intracellulaires de la voie Toll chez la drosophile, MyD88 et Cactus et deux homologues, Pelle et Rel1. Il est intéressant de noter que parmi ces protéines, 3 sont des régulateurs positifs de la voie (MyD88, Pelle et Rel1) et une est un régulateur négatif (Cactus). Par invalidation de ces gènes, il sera donc possible de supprimer l'activité de la voie ou de l'activer constitutivement. Les résultats donneront des indications précieuses sur le fait que cette voie soit conservée ou non chez l'anophèle et que ces facteurs agissent ou non dans la même voie. La suite de ce travail va se concentrer sur ces facteurs.

II.2.4. Les composants de la voie Toll sont-ils impliqués dans la production des peptides antimicrobiens et la résistance aux infections?

II.2.4.1. Rôle des homologues identifiés de la voie Toll dans la production des peptides antimicrobiens

Nous avons voulu savoir si les homologues des composants de la voie Toll étaient comme chez la drosophile responsables de l'expression d'un certain nombre de peptides antimicrobiens. Nous voulons vérifier si l'absence des régulateurs positifs (MyD88, Pelle) ou du régulateur négatif Cactus modifie la transcription des peptides. Nous avons donc réalisé les expériences classiques de Northern blotting après avoir invalidé ces gènes puis infecté les anophèles. En effet, il est possible chez l'anophèle de dépléter de manière spécifique un transcrite par ARN interférence en injectant simplement l'ARN double brin dans le thorax des anophèles (figure II.1) (Blandin *et al.*, 2002). On peut donc 4 jours plus tard injecter les microorganismes désirés pour mesurer l'effet de l'invalidation sur la production des peptides antimicrobiens. Nous avons utilisé les mêmes conditions d'infection que précédemment.

Les nombreuses expériences réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence de régulation des transcrits des peptides antimicrobiens par les homologues des éléments de la voie Toll chez l'anophèle (un exemple représentatif est présenté sur la figure II.13). En effet, l'invalidation de *MyD88* ne modifie pas la transcription des gènes codant pour les peptides antimicrobiens présents chez les anophèles, ni avant ni pendant l'infection. L'invalidation de *Pelle* entraîne un profil similaire. Par ailleurs, l'invalidation de *Cactus* ne provoque pas d'augmentation de l'expression de ces peptides, ce qui signifie que le facteur de transcription qu'il retient dans le cytoplasme

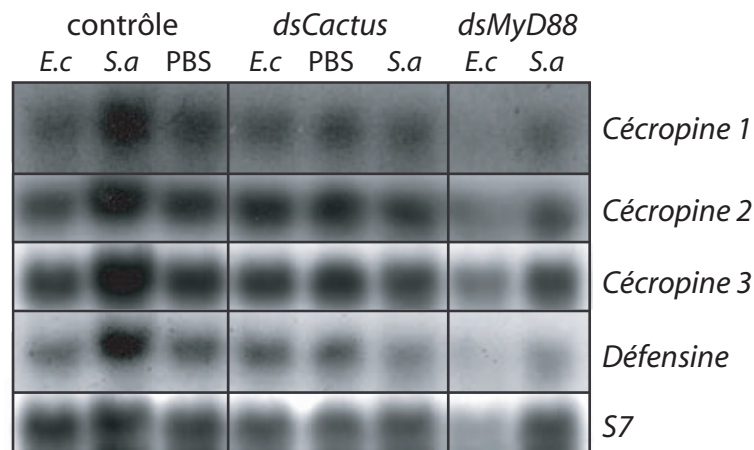


Figure II.13. Effet de l'inactivation de Cactus ou MyD88 sur la transcription des peptides antimicrobiens après une infection. Les anophèles sont injectées avec de l'ARN double brin dirigé contre *LacZ* (contrôle), *Cactus* (*dsCactus*) ou *MyD88* (*dsMyD88*). Elles sont injectées 4 jours plus tard par du PBS (contrôle), *E. coli* ou *S. aureus*. 24h après l'injection, les ARN sont extraits et transférés sur la membrane, qui sera hybridée successivement avec les sondes spécifiques des peptides antimicrobiens et du contrôle de dépôt S7.

(dans notre hypothèse, Rel1) n'est pas responsable de la transcription des peptides antimicrobiens (figure II.13). Il semble alors exclu que les homologues identifiés de la voie Toll aient un rôle dans la production de ces peptides.

II.2.4.2. Rôle des homologues identifiés de la voie Toll dans la résistance aux infections fongiques

Afin de savoir si les homologues identifiés de la voie Toll ont un rôle plus général dans la réponse à l'infection, nous avons réalisé des expériences de survie en utilisant le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Ce sont en effet ces survies que nous avons le mieux réussi à reproduire et caractériser. L'idée qui sous tend ces expériences est que la suppression d'un facteur fondamental pour la régulation de la réponse immunitaire des moustiques accélérera leur mort après une infection. Comme précédemment, les anophèles ont été injectés par l'ARN double brin dirigé contre les homologues identifiés de la voie Toll de la drosophile, *Pelle*, *MyD88*, *Cactus* ou *Rel1* et infectés 4 jours plus tard par *B. bassiana*. Nous avons pu observer que l'inactivation de *MyD88* ou de *Rel1* entraîne de manière répétée et reproductible une moins bonne survie au champignon *B. bassiana* (figure II.14). L'inactivation de *Pelle* n'a été réalisée qu'une fois, et sensibilise aussi les anophèles à l'infection, ce qui reste à confirmer. Par contre, l'inactivation de *Cactus* n'affecte pas la survie des anophèles suite à l'infection par *B. bassiana*, elle n'entraîne ni défaut de survie, ni protection des anophèles. Nous concluons donc que les homologues identifiés de la voie Toll de la drosophile chez l'anophèle

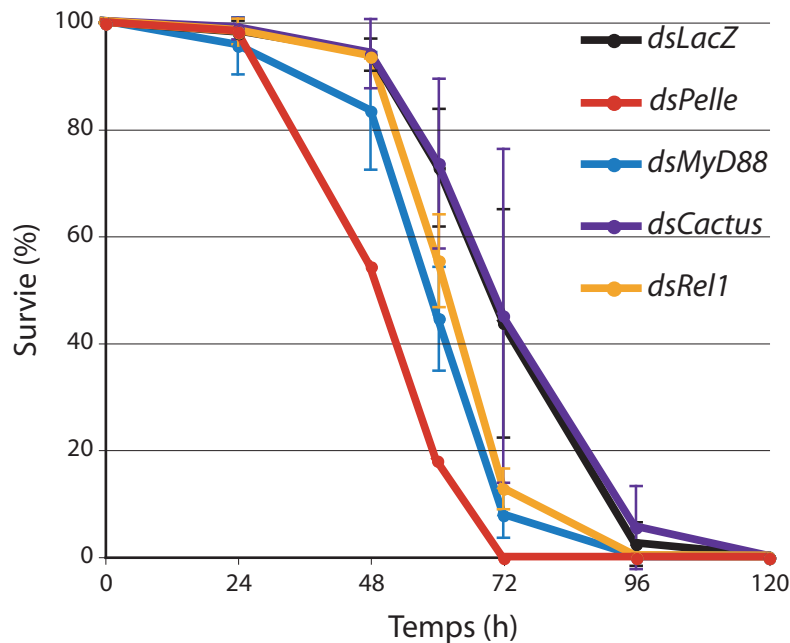


Figure II.14. Survie après une infection par le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Les anophèles sont injectés 4 jours avant l'infection avec des ARN double brin dirigés spécifiquement contre *LacZ* (courbe noire), *MyD88* (courbe bleue), *Pelle* (courbe rouge, 1 expérience), *Cactus* (courbe mauve) et *Rel1* (courbe jaune).

sont donc impliqués dans la régulation de l'infection fongique, cependant une activation de la voie ne suffit pas à protéger les anophèles de l'infection. Il est à noter que cette expérience nous permet de confirmer l'hypothèse que *MyD88*, *Pelle* et *Rel1* travaillent dans une même voie de signalisation qu'on pourrait donc appeler la « voie *Rel1* » ou « voie Toll » de l'anophèle, même si le récepteur reste inconnu.

II.3. Conclusions-discussion

Nous avons choisi dans ce chapitre d'utiliser des méthodes d'investigation proches de celles qui avaient été utilisées avec succès pour comprendre le système immunitaire de la drosophile et nous avons conclu qu'elles ne permettraient sans doute pas de décortiquer de manière similaire les voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire d'*A. gambiae*. La technique du Northern blot s'est avérée trop peu sensible pour détecter les variations de quantité de transcrite des peptides antimicrobiens après une infection, et les survies se sont avérées difficiles à répéter en général (sauf avec les champignons).

Chez la drosophile, la piqûre par une bactérie ou l'infection par un champignon entraîne l'induction rapide d'un certain nombre de peptides antimicrobiens. Cette induction transcriptionnelle est extrêmement forte (classiquement 50 fois), principalement parce que le taux basal de transcrite de ces gènes est quasiment nul. Nous avons pu constater ici que la situation est radicalement différente chez le moustique *A. gambiae*, puisque nous avons systématiquement détecté une quantité élevée de transcrits des peptides antimicrobiens chez l'anophèle. Cette observation peut être expliquée par la quantité importante de bactéries qui sont retrouvées dans les anophèles, ce qui n'est pas le cas des drosophiles qui sont stériles. Ainsi, les différences de mode de vie entre l'anophèle et la drosophile se traduisent elles peut-être au niveau moléculaire par cette production permanente de peptides antimicrobiens chez l'anophèle. Il a donc été impossible de mettre en évidence la régulation de peptides par la bactérie à Gram positif *S. aureus* ou par le champignon entomopathogène *B. bassiana*. L'infection par *E. coli* provoque l'augmentation de la transcription de la *Cécropine 1*, mais pas des autres peptides. Ceci nous pose un premier problème pour la suite de notre étude: les peptides antimicrobiens de l'anophèle ne pourront sans doute pas être utilisés comme rapporteurs de l'infection, comme cela avait été possible chez la drosophile. Chez la drosophile, les peptides antimicrobiens sont des marqueurs de l'infection essentiellement parce qu'ils sont presque indétectables en l'absence d'une infection expérimentale et fortement induits après celle-ci. Par ailleurs, ces résultats montrent aussi les limites de l'utilisation du Northern blotting chez l'anophèle ; en effet, dans ce cas, la technique n'est pas suffisamment quantitative, et l'augmentation de l'expression des peptides, si elle existe, ne peut pas être mesurée par cette technique. Nous n'avons pas pu mettre en évidence que l'expression de ces peptides soit contrôlée par les homologues identifiés de la voie Toll.

Une autre voie choisie pour étudier la réponse immunitaire de l'anophèle était la réalisation de tests de survie. Ces tests de survie ne sont pas encore au point en particulier en ce qui concerne les infections par des bactéries. Il serait intéressant de mettre au point des conditions d'infections plus reproductibles,

en utilisant d'autres souches de bactéries ou d'autres microorganismes. Mais le fort taux d'infection relevé chez les anophèles est peut être un obstacle de fait à l'utilisation de telles procédures, car il signifie que le système immunitaire est constamment induit (cf. la transcription permanente des peptides antimicrobiens). Les expériences de survie que nous avons réalisées suite à des infections fongiques ont donné des résultats beaucoup plus satisfaisants en termes de reproductibilité. Nous avons pu établir un protocole d'infection qui nous a permis de tester les homologues identifiés des composants de la voie Toll de la drosophile. Il est apparu que l'invalidation de *MyD88*, *Pelle* ou *Rel1* rend les moustiques susceptibles à l'infection par le champignon *B. bassiana*. Ces résultats permettent de suggérer que ces composants fonctionnent dans une même voie qui serait assez proche de la voie Toll de la drosophile et qui comme celle ci aurait un rôle dans la défense contre les infections fongiques.

Les résultats obtenus ici font écho à un ensemble de données récentes sur le système immunitaire d'*Aedes aegypti*. Ce moustique dont le génome est en cours d'assemblage est aussi un modèle couramment utilisé, notamment parce que la transgénèse est bien développée, ce qui permet de mettre en œuvre d'autres approches méthodologiques. L'équipe de Alexander S. Raikhel à Riverside a utilisé ces approches pour étudier en particulier les homologues de Rel1 et Rel2 chez *Aedes*, que nous nommerons AaRel1 et AaRel2. Les premiers travaux portent sur AaRel2 (Shin *et al.*, 2002), et ont permis de démontrer que ce facteur existe sous 3 isoformes au moins. Les protéines Rel2 d'anophèle et Relish de drosophile comportent un domaine de type I κ B et un domaine de type NF- κ B. Les trois isoformes décrites pour *Aedes* comportent l'un ou l'autre de ces domaines ou les deux. Une lignée transgénique surexprimant une forme dominant négative de AaRel2 présente un défaut d'induction de deux peptides antimicrobiens, AaDéfensineA et AaCécropine (Shin *et al.*, 2003). Cette lignée est aussi sensible aux infections par les bactéries à Gram négatif *E. cloacae*, cette sensibilité pouvant être restaurée par la surexpression simultanée de la défense. Par contre, la survie de cette lignée à des infections par des bactéries à Gram positif n'est pas altérée. Les travaux sur *AaRel1* (Shin *et al.*, 2005) ont montré que sa surexpression chez la drosophile permettait d'induire de manière spontanée la production de drosomycine (ce qui n'est pas le cas de la surexpression de *AaRel2*), et protégeait légèrement celles-ci contre les infections par le champignon *B. bassiana*. L'invalidation de *AaRel1* entraîne une sensibilité accrue des moustiques à une infection fongique (ce qui n'est pas le cas de l'invalidation de *AaRel2*), mais n'altère pas la survie à une infection par un mélange de bactéries à Gram positif (*M. luteus*) et négatif (*E. coli*). Des expériences à l'aide de constructions transgéniques surexprimant *AaRel1* (Bian *et al.*, 2005) ont permis de montrer que AaRel1 contrôle la transcription des gènes codant pour Spz1A (un homologue de spaetzle chez *Aedes*) et la Serpine 27A, mais pas des gènes codant pour les peptides antimicrobiens AaDéfensineA et AaCépropineA. L'invalidation de *AaCactus* entraîne l'induction des transcrits *Spz1A* et *Spn27A*, mais pas

de ceux correspondants aux peptides AaDéfensineA et AaCécropineA. Ceci suggère fortement que AaRel1 et AaCactus interagissent dans une même voie. Le fait que les transcrits *Spz1A* et *Spn27A* soient induits par l'infection fongique permet aux auteurs de proposer que la cassette AaCactus/AaRel1 contrôle chez *Aedes* la réponse antifongique. Chez *A. aegypti*, il a donc été démontré que Rel2 contrôle l'induction de certains peptides antimicrobiens et la réponse aux infections par les bactéries à Gram négatif, pendant que Cactus/Rel1 contrôle la réponse aux infections fongiques.

Ces données se rapprochent donc de celles que nous avons obtenues, qui montrent que la cassette Cactus/Rel1 ne contrôle l'expression d'aucun peptide antimicrobien, mais qu'elle est nécessaire pour une survie aux infections fongiques. Ce qui nous a manqué lors de l'étude de cette cassette, c'est l'existence de rapporteurs de la voie. Chez *Aedes*, ce sont les gènes codant pour *Spz1A* et *Spn27A* qui ont été utilisés à défaut des peptides antimicrobiens. Cependant, le rôle de ces deux gènes dans l'immunité antifongique n'a pas encore été démontré.

D'autres études ont été menées sur les infections fongiques chez les anophèles, notamment dans une perspective de lutte biologique contre ces insectes. En effet, les résistances des anophèles aux insecticides traditionnels sont maintenant classiques, et outre ceci, l'utilisation des insecticides à grande échelle a pu se révéler assez nocive pour l'environnement. Dans l'objectif de mettre au point de nouveaux moyens de lutte, un certain nombre d'équipes étudient donc l'incidence des infections fongiques sur la survie des anophèles (principalement *B. bassiana* et *M. anisopliae* du fait de leur disponibilité dans le commerce (Scholte *et al.*, 2004)). Ces travaux ont permis de montrer que la dispersion de spores diminue la survie des moustiques, que ce soit à l'échelle de cages au laboratoire (Blanford *et al.*, 2005) ou de maisons d'un village de Tanzanie (Scholte *et al.*, 2005). Par ailleurs, Blanford *et al.* ont pu montrer que cette mortalité accrue des anophèles se doublait d'un développement compromis des sporozoïtes de *Plasmodium chabaudi*. En cumulant les deux effets, on peut imaginer que l'utilisation des spores de champignons comme alternative aux insecticides serait un outil de choix dans la lutte contre le paludisme.

Les résultats obtenus suite aux infections fongiques résonnent de manière intéressante avec les expériences que nous avons conduites qui montrent que chez *A. gambiae* la cassette Cactus/Rel1 est responsable de la réponse à l'infection fongique. En effet, si les champignons activent cette voie de signalisation, alors une infection par le parasite *Plasmodium* réalisée postérieurement se fera dans un contexte immunitaire déjà activé. Pour tenter de reproduire ce résultat, nous avons voulu mettre au point un système d'infection fongique qui ne serait pas létal pour les anophèles (ou en tous cas, pas aussi vite que dans nos expériences précédentes, puisque la rapidité avec laquelle cette infection tue les anophèles empêche toute expérience de suivi d'une infection par le plasmodium). Nous avons donc réalisé des

expériences d'injection de spores, afin de contrôler les doses injectées. Ces expériences nous ont permis de trouver une concentration limite qui ne tue pas les anophèles (l'injection de 690 spores par anophèle est létale à 4 jours, l'injection de 345 spores par anophèle les tue assez régulièrement et lentement, l'injection de 69 spores ne les tue pas). Nous avons réalisé des expériences d'infection des anophèles par injection de 69 spores puis nous avons infecté ces anophèles 4 jours plus tard. Les oocystes ont été comptés après 10 jours, mais nous n'avons pas observé de différence significative entre les moustiques non infectés par *B. bassiana* et les moustiques infectés. Lorsque nous avons réalisé ces expériences, il nous manquait néanmoins un élément fondamental pour suivre l'infection, à savoir un gène rapporteur de cette infection. Depuis, nous avons réalisé des expériences de PCR quantitative qui montrent que le gène *TEP1* (ThioEster containing Protein 1) est induit après cette infection. Il faudrait donc vérifier que dans les conditions où nous réalisons l'infection, ce gène rapporteur est bien induit. Par ailleurs, des expériences sont en cours pour déterminer si l'expression de ce gène est sous le contrôle de Rel1 ou de Rel2 dans ces conditions. Ceci serait un argument direct pour affirmer que la cassette Cactus/Rel1 est bien induite lors de l'infection fongique. Par ailleurs, il faudrait réaliser de nouveau cette expérience en utilisant comme « read out » final le nombre de sporozoïtes présents, puisque Blanford *et al.* ont montré que l'infection fongique avait un impact sur la quantité de sporozoïtes.

Un des aspects que nous n'avons pas réussi à développer de manière satisfaisante ici est l'étude des infections bactériennes. Nous avons vu que les données acquises chez *A. aegypti* montrent que les peptides antimicrobiens sont régulés par AaRel2, qui est aussi responsable de la résistance aux infections par certaines bactéries à Gram négatif, mais qui n'a pu être impliqué dans la réponse contre les bactéries à Gram positif. Le laboratoire de Fotis Kafatos a travaillé plus particulièrement cet aspect chez *A. gambiae*, en utilisant des approches assez similaires. Ils ont pu montrer (Meister *et al.*, 2005) que AgRel2 existe sous au moins deux isoformes, une contenant les domaines RHD et Ankyrine et l'autre portant seulement le domaine RHD. Ils ont montré que dans la lignée cellulaire Sua1B, AgRel2 mais pas AgRel1 est responsable de la transcription du peptide antimicrobien AgCécropine 1. Ils ont pu montrer aussi dans cette lignée cellulaire que la suppression d'AgImd entraîne une réduction de l'induction de AgCécropine 1. Ceci suggère que comme chez la drosophile AgImd et AgRel2 fonctionneraient dans une même cascade. *In vivo*, ils ont démontré que l'invalidation de *AgRel2* rend les anophèles sensibles aux infections par la bactérie à Gram positif *S. aureus* et par la bactérie à Gram négatif *E. coli*. L'invalidation de *AgImd* a un effet moins prononcé sur la survie, puisque les anophèles ainsi traités ne sont pas sensibles aux infections par la bactérie *E. coli* et sont légèrement sensibles aux infections par la bactérie *S. aureus*. Ainsi les premiers éléments obtenus sur Rel2 chez l'anophèle semblent indiquer que ce facteur de transcription

régulerait la réponse antibactérienne. Pour valider définitivement cette vue, il faudrait réaliser des expériences de survie supplémentaires avec d'autres microorganismes, et tester *in vivo* l'influence de Rel2 sur l'expression des peptides.

Ainsi à la suite du travail présenté ici et des études menées en parallèle dans d'autres laboratoires, le système immunitaire de l'anophèle est maintenant mieux connu. La fonction de la cascade « Toll » dans la réponse antifongique semble relativement conservée, en tous cas de manière certaine pour les éléments intracellulaires MyD88 et Rel1. La fonction de la cascade « Imd » semble avoir été élargie à la réponse contre les bactéries à Gram positif, mais aussi à la production de l'ensemble des peptides. Par contre, la dissection moléculaire de cette cascade n'a pas été réalisée, et hormis Imd et Rel2, aucun autre élément n'a été étudié.

Les résultats présentés ici constituent une première avancée mais il reste du travail afin de valider définitivement ces hypothèses et surtout de présenter un modèle intégrant plus de données fonctionnelles. Les survies avec d'autres pathogènes, notamment bactériens, doivent absolument être mises au point. Par ailleurs, il reste à démontrer *in vivo* que Rel2 régule bien la transcription de l'ensemble des peptides antimicrobiens, ce qui devrait être fait par PCR quantitative pour affiner l'analyse au vu des faibles différences d'induction observées dans nos conditions expérimentales.

Au sujet des homologues intracellulaires de la voie Toll, le travail a donc bien avancé chez l'anophèle. Une question intéressante qui n'a pas été étudiée de manière exhaustive, est celle de l'identité du ou des récepteurs de la voie Toll de l'anophèle, en effet, le génome de l'anophèle compte au moins 10 protéines de la famille des récepteurs Toll (Christophides *et al.*, 2002).

Nous n'avons pas dans cette partie posé la question du rôle de la « voie Rel1 » au cours de l'infection par *P. berghei*, c'est ce que nous allons faire dans le chapitre suivant.

Chapitre III

Rôle de la famille NF- κ B dans l'immunité contre *P. berghei*

Dans les deux premières parties de ce travail, nous nous sommes attaché à améliorer notre connaissance des cascades de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire de l'anophèle et particulièrement la « voie Toll ». Nous n'avons pas posé la question du rôle de cette voie de signalisation lors de l'infection par *Plasmodium*. Pour compléter l'étude, nous

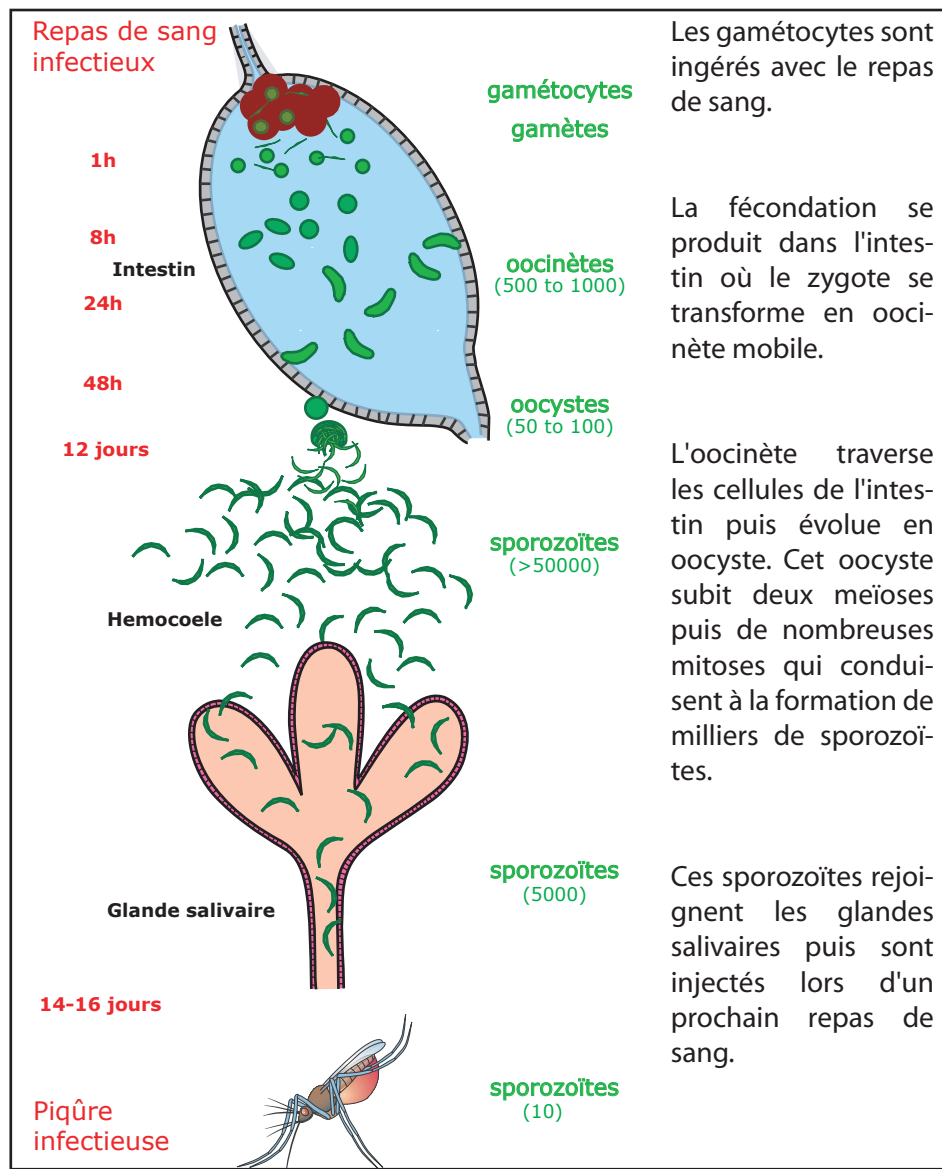


Figure III.1. Cycle de développement des plasmodiums chez l'anophèle

avons donc examiné le rôle des homologues des composants de la voie Toll dans la réponse intervenant après l'infection par le parasite *P. berghei*. Notre étude s'est concentrée sur une partie du cycle du parasite où celui-ci subit une réduction drastique de sa population (Sinden, 1999) (figure i.5 et figure III.1). Au cours de son cycle de développement chez le moustique, le parasite subit un certain nombre de transformations. Les gamétocytes sont introduits dans l'intestin à l'occasion d'un repas de sang chez un individu infecté puis mûrissent en gamètes et fusionnent en zygotes. Les zygotes se développent rapidement en ookinètes mobiles, capables de traverser la paroi de l'intestin. Les ookinètes rejoignent la membrane basale des cellules de l'intestin où ils mûrissent en oocystes. 10 jours après l'infection, les oocystes libèrent dans l'hémolymphe des sporozoïtes, qui migrent alors vers les glandes salivaires pour être injectés lors d'une prochaine piqûre. Il a été démontré qu'au cours de ce cycle de développement, le parasite subit de grandes pertes, notamment lors de la traversée de l'intestin par les ookinètes (figure i.5 et figure III.1).

On sait qu'une réponse immunitaire intervient à ce moment (voir l'introduction de cette thèse), puisque la suppression de tel ou tel gène peut modifier la quantité d'oocystes présents dans l'intestin 10 jours après l'infection (Blandin *et al.*, 2004; Osta *et al.*, 2004). Nous avons choisi le stade oocyste comme « read out » de nos expériences, car il traduit le résultat des pertes d'ookinètes intervenant dans l'intestin.

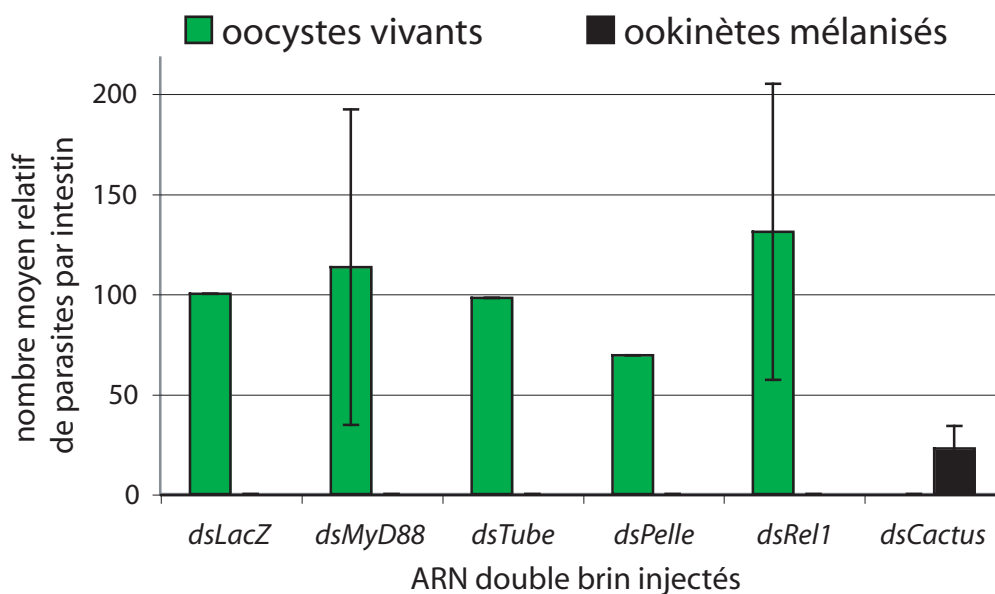


Figure III.2. Comptage des oocystes dans les intestins d'*A. gambiae* 10 jours après l'infection par *P. berghei*-GFP. 0,2µg d'ARN double brins dirigés spécifiquement contre certains gènes ont été préalablement injectés aux moustiques. Les moyennes obtenues pour chaque point dans chaque expérience indépendante (3 expériences pour chaque point sauf *dsTube* et *dsPelle*, 1 expérience) sont rapportées à la moyenne du contrôle (*dsLacZ*) arbitrairement fixée à 100 pour toutes les expériences. La moyenne de ces valeurs et l'écart type des moyennes sont présentés sur ce graphique. Aucune différence significative n'est observée après l'injection d'ARN double brin dirigé contre *MyD88*, *Tube*, *Pelle* ou *Rel1*. Par contre aucun parasite vivant n'est plus détecté après l'injection d'ARN double brin dirigé contre le gène codant pour le régulateur négatif *Cactus*.

La technique de l'interférence à l'ARN permet de tester *in vivo* le rôle de gènes candidats. Nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'implication dans une voie de type Toll si elle existe ne fait pas de doute: MyD88, Cactus, Rel1. Nous avons aussi testé les deux kinases Tube et Pelle. Les femelles anophèle sont injectées un jour après leur émergence et nourries ensuite sur une souris infectée par le parasite fluorescent *P. berghei*-GFP (Franke-Fayard *et al.*, 2004). Les intestins sont disséqués après 10 jours puis observés au microscope et les parasites comptés. La suppression des transcrits des régulateurs positifs de la voie, MyD88 ou Rel1 ne modifie pas la quantité d'oocystes observés par rapport au contrôle (figure III.2). Ces deux injections donnent toujours de très grandes variations d'une expérience à l'autre, d'où les écart types relativement larges. L'expérience a été conduite une fois pour tester le rôle éventuel de Tube et Pelle. Elle a donné un résultat similaire. L'ensemble de ces données montrent que les homologues identifiés des régulateurs positifs de la voie Toll ainsi que la kinase Tube n'ont pas de rôle évident dans la réponse immunitaire qui intervient au début de l'infection par *P. berghei*. Il est intéressant de noter cependant que la grande variabilité des résultats d'une expérience à l'autre, variabilité qui est reproductible, a peut être un sens qui reste inconnu pour le moment. Cependant ces résultats montrent que cette voie n'est pas impliquée dans la réponse contre *P. berghei*: soit elle est induite mais n'a pas d'effet, soit elle n'est pas induite.

Nous avons aussi invalidé le gène codant pour le régulateur négatif de la voie, Cactus, puis infecté les moustiques correspondants. De manière frappante, 10 jours après l'infection, aucun oocyste n'a pu être détecté dans l'intestin des moustiques invalidés pour *Cactus*. Les parasites ont donc tous été éliminés avant ce stade. Quelques ookinètes mélanisés sont observés (figure III.2). La suppression du régulateur négatif I κ B/Cactus rend donc les anophèles réfractaires à *P. berghei*.

Les expériences d'infection par *P. berghei* montrent que la suppression d'homologues des régulateurs positifs de la voie Toll comme MyD88 ou Rel1 ne provoque pas de changement sur la progression du parasite jusqu'au stade oocyste. Par contre, en activant la voie via la suppression du transcrit de *Cactus*, on stoppe complètement la progression du parasite. C'est la première fois qu'un tel phénotype est mis en évidence. Nous avons voulu comprendre les mécanismes qui pourraient expliquer ce phénotype et connaître les facteurs de transcription à l'origine de cet effet.

III.1. Modifier l'immunité basale des anophèles influe sur leur sensibilité vis à vis de *P. berghei*

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'un manuscrit soumis pour publication. La question que nous posons ici est celle du rôle des voies de type NF- κ B dans la régulation de la réponse immunitaire contre *P. berghei*.

Boosting NF- κ B Dependent Basal Immunity of *Anopheles gambiae* Aborts Development of *Plasmodium berghei*

Cécile Frolet, Martine Thoma, Stéphanie Blandin, Jules A. Hoffmann & Elena A. Levashina[#]

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR9022 du CNRS, équipe "Avenir" INSERM, 15 rue R. Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

Running Title: NF- κ B-dependent Basal Immunity of *A. gambiae* to *P. berghei*

[#] To whom correspondence should be addressed. E-mail: E.Levashina@ibmc.u-strasbg.fr. Tel: (33) 388 41 70 18 / fax: (33) 388 41 60 69 22.

Introduction

Infectious diseases caused by protozoa, such as malaria, sleeping sickness, Chaga's disease or leishmaniasis, are a major threat to human health. Most of these pathogenic single-celled organisms have complex life cycles and are transmitted to humans by vector insects. A dramatic example is the transmission by the mosquito *Anopheles gambiae* of the major causative agent of human malaria in Sub-saharan Africa, the protozoan parasite *Plasmodium falciparum*. It is now well established that the insect vector reacts to the invasion by the parasite by mounting an immune response (reviewed in Blandin and Levashina, 2004). Indeed, in the laboratory model conventionally used for the study of malaria transmission, *i.e.* *A. gambiae* – *P. berghei*, insect immune proteins were recently identified which affect parasite development within the mosquito midgut (Blandin et al., 2004; Meister et al., 2005; Michel et al., 2005; Osta et al., 2004). The first of the proteins to be identified is a thioester-containing protein, with stringent similarity to complement factors C3/C4/C5 and to α_2 -macroglobulins, and referred to as TEP1 (Levashina et al., 2001). This protein is produced in the mosquito blood cells, binds to the surface of the invading parasite and induces its killing (Blandin et al., 2004). The mechanism of the TEP1-dependent

parasite recognition and killing is currently under investigation. Expression of *TEP1*, and that of other genes involved in antiparasitic responses, is induced by *P. berghei* infection (Blandin et al., 2004; Dimopoulos et al., 2002; Osta et al., 2004). To date, the regulation of expression of these genes during the *Plasmodium* infection remains largely unknown in adult *Anopheles* and is the focus of the present study.

It is generally accepted that the host defenses in insects are predominantly inducible. In *Drosophila melanogaster*, the best studied insect model organism, bacterial or fungal infections triggers activation of two major intracellular signaling cascades, Toll and Imd. The Toll and Imd pathways activate two distinct NF- κ B modules in the adult fruitflies: I κ B/Cactus - Dif and Relish, a composite molecule which has a C-terminal inhibitory domain equivalent to Cactus (reviewed in Hoffmann, 2003). The *Anopheles* genome contains two NF- κ B family members: Rel1/Gambif1 and Rel2/Relish (hereafter referred to as Rel1 and Rel2, respectively), as well as a gene encoding an orthologue of *Drosophila* Cactus, (Figure 1A) (Barillas-Mury et al., 1996; Christophides et al., 2002).

To address the regulation of immune genes during *Plasmodium* infection in mosquitoes, we have chosen the *TEP1* gene which contains in its promoter region sequence motifs similar to the canonical NF- κ B binding sites (Figure 1B) and for which a wealth of information and tools

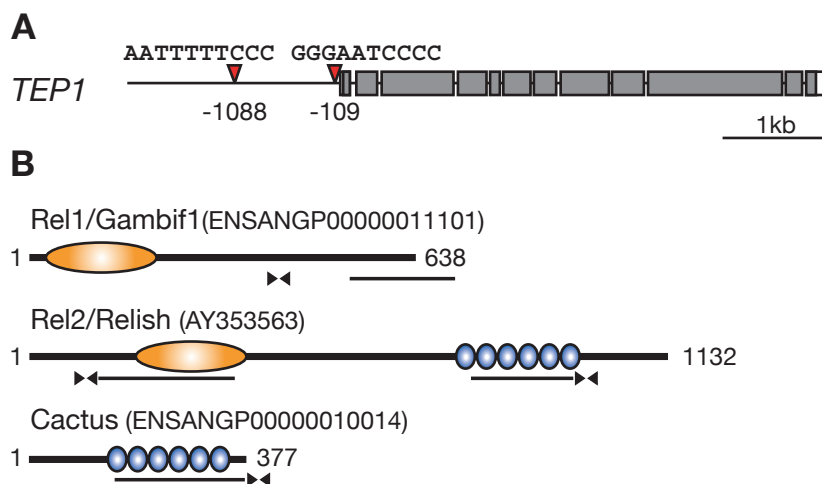


Figure 1. Organization of *TEP1* promoter and members of I κ B/NF- κ B family in *A. gambiae*

(A) Canonical NF- κ B sites in the promoter of the *TEP1* gene identified by Genomatix suite. (B) Schematic depiction of the I- κ B/NF- κ B family members in *A. gambiae* and the accession numbers of sequences used in this study (Rel1 – ENSANGP00000011101; Rel2 – AY353563, Cactus – ENSANGP00000010014). Orange ellipses represent Rel homology domains and blue circles - ankyrin repeats. Black bars underline regions targeted by dsRNA. Note that the targeted sequence in *Rel1* partially overlaps with 3'-UTR, and that a mixture of two dsRNAs was used to silence *Rel2* gene. Locations of primers used for quantitative PCR are indicated by black triangles (*Cactus* amplicon includes 3'-UTR region).

are now available. We focused on the midgut stages of invasion of the rodent malaria parasite *P. berghei*. Following an infected blood meal, the fusion of male and female gametes generates a diploid motile zygote, the ookinete, which rapidly invades the epithelial cells of the mosquito upon reaching the basal side of the midgut, transforms into an oocyst. Two weeks later the sporogonic oocyst releases thousands of newly formed sporozoites that migrate to, and invade the salivary glands. The parasite cycle within the mosquito is completed when the sporozoites are injected into a mammalian host during a mosquito bite (reviewed in Sinden, 2002).

The results presented below demonstrate that indeed NF- κ B factors play a role in the regulation of *TEP1* levels in the mosquito. Using *TEP1* transcriptional profiling and cell biology methods, we distinguish three phases in the antiparasitic response. In the pre-invasion period, *TEP1* synthesis is strictly dependent on NF- κ B (possibly with a strongest input of Rel2). The invasion period is characterized by a massive secretion of *TEP1* from the blood cells and by binding of *TEP1* to the parasites. This is followed by a replenishment period, which involves a marked increase in *TEP1* transcription and protein synthesis in the blood cells. Contrary to our expectations, this infection-induced up-regulation of *TEP1* expression is independent of NF- κ B, suggesting that in the case of *TEP1*, NF- κ B controls only the basal level of expression at the pre-invasion period, to which we refer as basal immunity. Based on two following observations, we propose that this NF- κ B-dependent basal immunity controls the efficiency of the antiparasitic response in *A. gambiae*: (i) concomitant depletion of Rel1 and Rel2 by RNAi reduces *TEP1* basal expression level and mitigates mosquito resistance to *Plasmodium*; (ii) depletion of the NF- κ B inhibitor I- κ B/Cactus boosts the basal expression of *TEP1* and completely aborts parasite development at the ookinete stage. Our findings stress the crucial role of pre-invasion NF- κ B-dependent basal antiparasitic defenses which are based in part on circulating complement-like proteins.

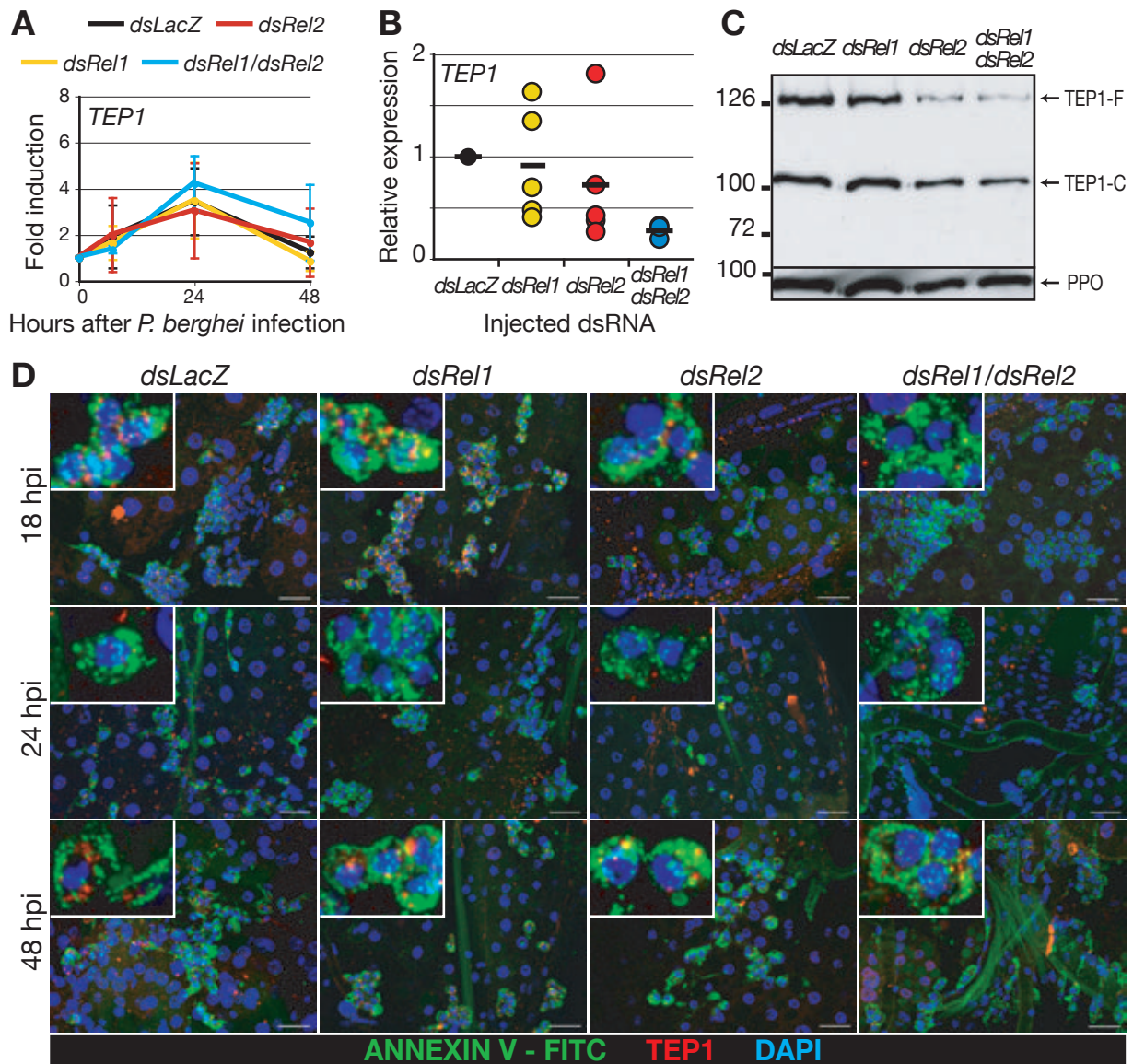


Figure 2. TEP1 expression at different time points after an infectious feeding with *P. berghei*, in Rel1 and / or Rel2 depleted mosquitoes.

(A) *TEP1* induction levels measured by quantitative real-time PCR 0, 7, 24 or 48 hours after an infectious feeding. Mosquitoes were injected with dsRNA specific for *LacZ* as a control (*dsLacZ*), *Rel1* (*dsRel1*), *Rel2* (*dsRel2*) or *Rel1* and *Rel2* (*dsRel1/dsRel2*) 4 days prior to the infection. Transcript levels were normalized using an internal control transcript for mitochondrial carrier protein (MC) and are shown as fold induction relative to the expression levels of each gene before infection (time 0). Mean values and standard deviations of 3 to 5 independent experiments are plotted for each time point (10 mosquitoes per point).

(B) Comparison of the basal level of *TEP1* expression 4 days after injection of *dsRel1*, *dsRel2* and *dsRel1/dsRel2* before *Plasmodium* infection relative to the level of *TEP1* expression in the *dsLacZ* control.

(C) Representative immunoblotting analysis of the hemolymph of *dsLacZ*, *dsRel1*, *dsRel2* or *dsRel1/dsRel2* collected 0, 1 or 4 days after injection of dsRNA. 10 mosquitoes were used per time point. TEP1 antibody recognizes a full-length (TEP1-F) and a cleaved (TEP1-C) form. An antibody against hemocyte-specific prophenoloxidase (PPO) of *A. gambiae* was used as a loading control. Molecular weight scale is on the left.

(D) TEP1-positive signal (red) is detected in the hemocytes attached to the mosquito abdominal cuticles stained with annexin V (green) at 18, 24 and 48 h after infectious feeding. dsRNAs for *LacZ* (control), *Rel1*, *Rel2* and *Rel1/Rel2* were injected 4 days before infection. Note that TEP1 signal is reduced in *dsRel2*

Results

Roles of Rel1 and Rel2 in pre- and post-invasion expression of the antiparasitic gene *TEP1*.

In mosquitoes, dsRNA treatment is efficient in silencing the expression of genes in immune-responsive tissues, such as the blood cells, the fat body and the midgut epithelium (Blandin et al., 2002). To explore whether NF- κ B is involved in the control of *TEP1* expression, 1 day-old females were injected with either *dsRel1*, *dsRel2*, *dsRel1/dsRel2* or *dsLacZ* as a control to ensure that the observed effects are not a mere result of the dsRNA treatment. In all experiments, *Rel2* was targeted using concomitantly two dsRNAs against both the Rel homology and ankyrin domains to achieve complete silencing of this complex gene (Meister et al., 2005). Four days after dsRNA injection, the mosquitoes were allowed to feed on an infected mouse carrying GFP-parasites (Franke-Fayard et al., 2004), and *TEP1* transcript levels were determined by quantitative real-time PCR at different time points following infection (post-invasion period). As illustrated in Figure 2A, in the control *dsLacZ*-injected mosquitoes, *TEP1* was constitutively expressed at a significant level before infection, and was up-regulated by three-fold 24 h post infection (hpi). We noted a transient character of this up-regulation of transcription, as the levels of transcripts of *TEP1* were back to the initial pre-invasion figures already at 48 hpi. Neither the depletion of Rel1, Rel2 nor the *dsRel1/dsRel2* double knockdown significantly affected the fold induction of *TEP1*, indicating that the *Plasmodium*-dependent up-regulation of *TEP1* expression does not require NF- κ B family members (Figure 2A). We next turned our attention to the level of expression of *TEP1* before infection (pre-invasion period) and analyzed whether it was dependent on NF- κ B members. In uninfected mosquitoes, the levels of *TEP1* transcripts were significantly lower in *dsRel1/dsRel2* double knockdowns, as compared to *dsLacZ* control. Single *dsRel1* or *dsRel2* knockdowns resulted in a more subtle reduction in the expression levels (Figure 2B).

The fact that NF- κ B regulates the basal, pre-invasion level of *TEP1* expression was further confirmed at the protein level by immunoblotting. As shown in Figure 2C, the TEP1 antibody recognizes a full length and a cleaved form of TEP1 in the hemolymph of control, pre-invasion mosquitoes (Levashina et al., 2001). The intensity of the TEP1-positive signal was clearly decreased in the hemolymph of double *dsRel1/dsRel2* knockdown, as well as in the *dsRel2* knockdown mosquitoes.

mosquitoes, and is barely detectable in double *dsRel1/dsRel2* knockdown at 18 h post infection. Parasite invasion at 24 h results in massive secretion of TEP1. TEP1 replenishment is observed in all experimental groups 48 h post infection. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars, 20 μ m.

We extended our analysis to the cell biology of *TEP1* expression using immunofluorescence at 18, 24 and 48 hpi. In these experiments, we examined whole mount preparations of blood cells attached to the abdominal walls using the TEP1 polyclonal antibody and FITC-labeled annexin V. We show that annexin V interacts with the mosquito blood cells, and, therefore, can be used as a hemocyte marker in *A. gambiae*. A strong TEP1 signal was consistently observed in control mosquitoes (compare Figures 2D and 4D, *dsLacZ*) and persisted up to 18 hpi, *i.e.* the time when the first wave of invading ookinetes egress from the basal side of the midgut cells. Interestingly at 24 hpi, hemocytes appeared devoid of TEP1, suggesting that the parasite infection induced massive TEP1 secretion. The signal was again clearly detectable at 48 hpi pointing to a replenishment phase of the protein in the blood cells, which is consistent with the transcriptional data on *TEP1* up-regulation at 24 hpi presented above (see Figure 2A). As expected, the immunofluorescence signals were barely detectable in double *dsRel1/dsRel2* knockdowns at 18 hpi, which in the context of infection still corresponds to a pre-invasion period as the ookinetes are just about to reach the basal side of the midgut (Figure 2D). The TEP1 signal was low, but detectable in the *dsRel2*-treated mosquitoes and was similar to controls in *dsRel1* knockdown. At 24 hpi, hemocytes were devoid of TEP1 signal in all types of knockdowns, as was the case in the controls. Importantly, the clear replenishment of TEP1 in hemocytes observed in controls at 48 hpi, was not affected by depletion of any of the NF- κ B factors examined, indicating that this phenomenon is NF- κ B-independent, thus confirming the transcriptional data presented above.

Taken together, our results indicate that expression of the *TEP1* gene in *A. gambiae* can be divided into pre-invasion and post-invasion phases. The pre-invasion layer is characterized by a basal level of expression of *TEP1* (hereafter referred to as basal immunity) regulated by Rel1 and Rel2. The massive secretion of TEP1 at 24 hpi coincides with the transcriptional up-regulation of its expression, and is probably controlled by a feedback mechanism aimed at replenishing the protein depleted from the circulation, or by an as yet unknown signaling cascade. We conclude that the NF- κ B factors Rel1 and Rel2 are dispensable for the parasite-induced up-regulation of *TEP1*.

Silencing of basal immunity mitigates resistance of *A. gambiae* to *P. berghei*.

We next examined whether decreasing the level of basal immunity as defined above would affect mosquito resistance to *P. berghei*. In these experiments, we injected dsRNA four days before infection and counted the number of live GFP-expressing oocysts on the dissected midguts in control and experimental mosquitoes 10 days post infection (dpi). Depletion of Rel1 or Rel2 did

not significantly affect parasite survival within the mosquito. In contrast, a significant 2.5-fold increase in the parasite numbers was observed in the *dsRel1/dsRel2* mosquitoes (Figure 3). These results indicate that the level of basal immunity plays an important role in the mosquito resistance to *P. berghei*. We also observed melanized parasites in *dsRel2* and in *dsRel1/dsRel2* mosquitoes, suggesting that the Rel2 signaling module negatively controls expression of genes involved in melanization reactions.

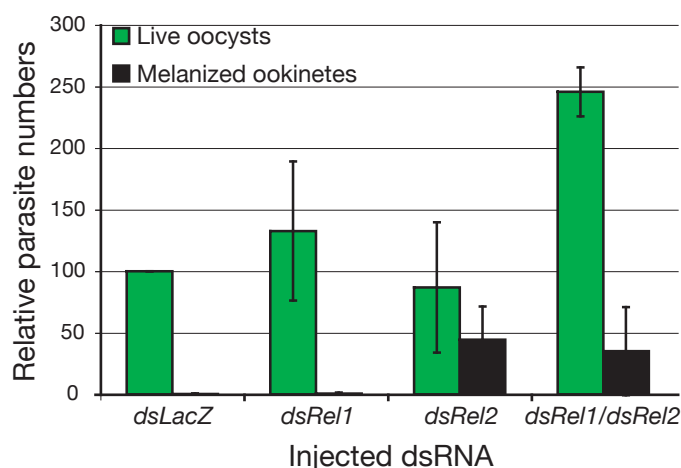


Figure 3. Depletion of Rel1 and Rel2 facilitates parasite development in the mosquito midgut. Survival of GFP-parasites in mosquitoes depleted for Rel1 (*dsRel1*), Rel2 (*dsRel2*) or Rel1 and Rel2 (*dsRel1dsRel2*) is compared to control *dsLacZ*-injected mosquitoes. Midguts were dissected 10 days after infection, and fixed. GFP-expressing oocysts and melanized ookinetes were scored by microscopy. Mean numbers of developing parasites per group (8 to 44 mosquitoes) in 3 to 5 independent experiments are expressed relative to the mean number in the corresponding *dsLacZ* group. Vertical lines indicate standard deviations.

Signal-independent activation of the Cactus/Rel1 signaling module boosts the basal level of *TEP1* expression.

As shown above, decreasing the level of basal immunity significantly affects the susceptibility of mosquitoes to parasite infections. To provide additional evidence for the role of the NF- κ B family members in the control of basal immunity, we developed a method to boost the pre-invasion levels of immune gene expression by silencing the gene encoding the negative regulator I κ B/Cactus. Indeed using this approach, *TEP1* transcript levels were markedly increased 12 h after injection of *dsCactus* (Figure 4A). Importantly, the concomitant depletion of Cactus and Rel1 reduced the transcript levels down to those of controls. In contrast, the increased level of *TEP1* expression was not affected in the *dsCactus/dsRel2* mosquitoes, indicating that transcriptional up-regulation of *TEP1* in the *Cactus*-deficient background was strictly dependent on Rel1 and independent of Rel2. The Rel1-dependent up-regulation of *TEP1* transcription was corroborated at the protein level by immunoblotting. The *TEP1*-positive signal in the hemolymph was stronger in *dsCactus* than in control mosquitoes at 4 days after dsRNA injection (Figure 4B). Furthermore, the transcriptional up-regulation of *TEP1* and the subsequent *de novo* protein synthesis induced by *Cactus* knockdown was dependent on Rel1, as lower levels of *TEP1* were observed in double

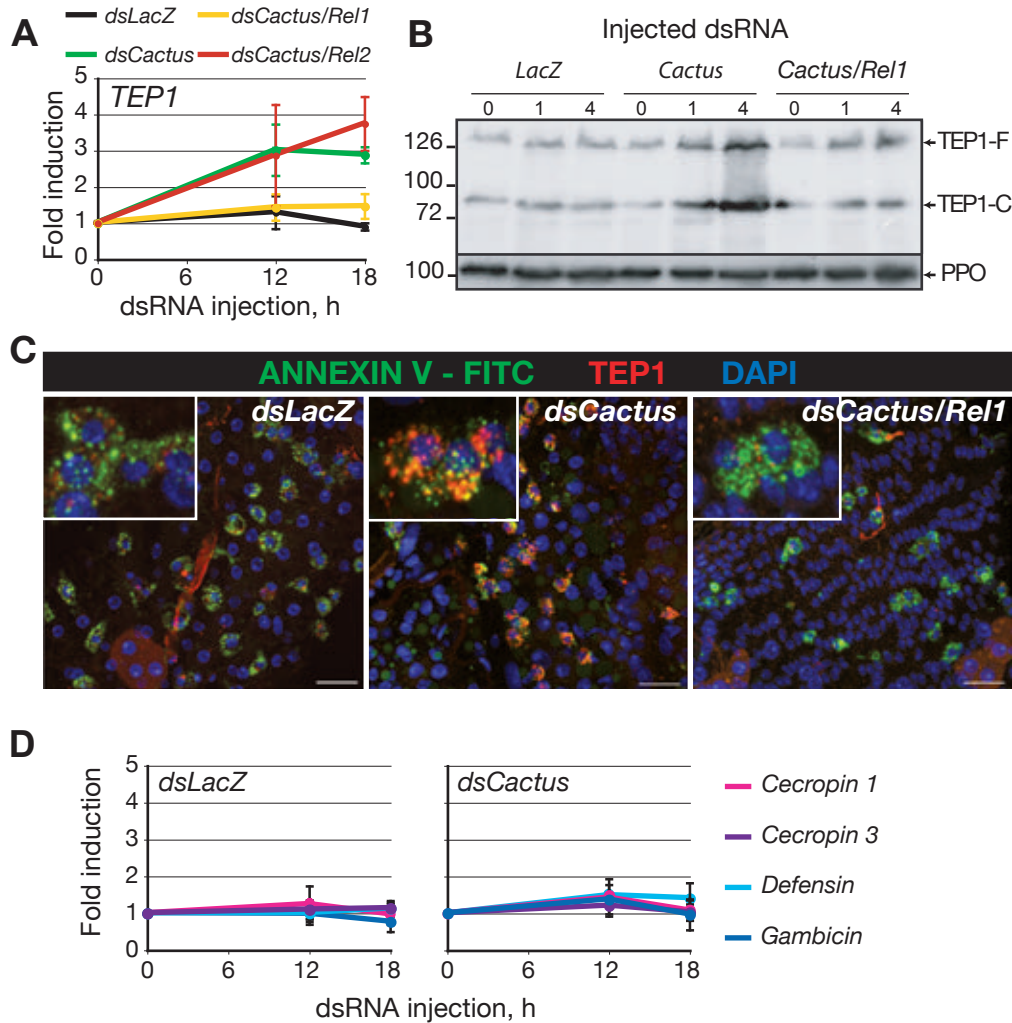


Figure 4. *TEP1* expression is up-regulated by the depletion of *Cactus*.

(A) Expression of *TEP1* at 0, 12 and 18 h after injection of *dsLacZ* (control), *dsCactus*, *dsCactus/dsRel1* and *dsCactus/dsRel2*. Levels of transcripts were normalized using an internal control transcript for ribosomal protein S7 and are shown as fold induction relative to the expression level of *TEP1* before injection of dsRNA (point 0). Mean values \pm s.e.m. of three to four independent experiments (10 mosquitoes per group) are plotted.

(B) Immunoblotting of hemolymph from control (*dsLacZ*), *Cactus* depleted (*dsCactus*) and *Cactus* and *Rel1* depleted mosquitoes (*dsCactus/dsRel1*) (15 mosquitoes per group). Hemolymph was collected 0, 1 and 4 days after dsRNA injection. *TEP1* polyclonal antibody recognizes a full-length (*TEP1-F*) and a cleaved form (*TEP1-C*) of the protein. Antibody against hemocyte-specific prophenoloxidase (*PPO*) of *A. gambiae* was used as a loading control. Molecular weight scale is on the left.

(C) Strong *TEP1*-positive signal (red) is detected in the mosquito blood cells stained with annexin V (green) 20 h after injection of *dsCactus*, whereas weaker *TEP1* signal was detected in the control *dsLacZ* mosquitoes and in double *dsCactus/dsRel1* knockdown. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars, 20 μ m.

(D) Expression of *Defensin*, *Gambicin*, *Cecropin 1* and *Cecropin 3* at 0, 12 and 18 h after injection of *dsLacZ* (control) and *dsCactus*. Levels of transcripts were normalized using an internal control transcript for ribosomal protein S7 and are shown as fold induction relative to the expression levels of each gene before injection of dsRNA (point 0). Mean values \pm s.e.m. of three to four independent experiments (10 mosquitoes per group) are plotted.

dsCactus/dsRel1 knockdown than in *dsCactus* mosquitoes. We also examined the induction of *TEP1* expression at the cellular level. A strong *TEP1*-positive signal was detected in blood cells of *dsCactus* but not *dsLacZ* or *dsCactus/dsRel1* mosquitoes indicating that the Cactus/Rel1-dependent up-regulation of *TEP1* expression is cell-autonomous (Figure 4C).

In *D. melanogaster*, Cactus negatively controls expression of a number of immune genes, including antimicrobial peptides in the blood cells and in the fat body (Irving et al., 2001). To test whether in *Anopheles* depletion of Cactus would also result in a general induction of antimicrobial peptide genes, we extended our analysis to the expressions of *Cecropin 1* and *3*, *Defensin* and *Gambicin* and noted that they were not affected in *dsCactus* mosquitoes (Figure 4D). Our results indicate that signal-independent activation of the Cactus/Rel1 module leads to the specific up-regulation of defined Rel1 target genes in the mosquito blood cells.

Cactus depletion induces expression of TEP1 in the blood cells and precocious binding of TEP1 to ookinetes in infected mosquitoes.

The results, reported in the previous section, focused on the pre-invasion period in *dsCactus*-treated mosquitoes. We next followed *TEP1* at the protein and transcriptional levels in *Cactus* deficient mosquitoes at post-invasion stages. To do so, we examined *TEP1* expression in the blood cells at 18, 24 and 48 hpi by immunofluorescence as described above. We observed a very strong *TEP1* signal at 18 hpi (Figure 5A). Strikingly, the *TEP1* signal was barely detectable at 24 hpi, confirming our observation that parasite invasion causes massive secretion of *TEP1* at this time point (see Figure 2D). Finally, a *TEP1*-positive signal was detected at 48 hpi, reflecting the replenishment of the pool of the protein in the blood cells.

These results were confirmed at the transcriptional level. As expected, the basal level of *TEP1* expression in the *Cactus*-deficient mosquitoes was found to be three-fold higher than in controls four days after injection of *dsCactus* *i.e.* at the time selected for *Plasmodium* infection (Figure 5B, time point 0). We found that in the *Cactus* deficient background, infection further up-regulated expression of *TEP1* by three-fold at 24 hpi. However, the depletion of Cactus did not change the transient character of this parasite-dependent induction, as the transcript levels of *TEP1* were back to those of control mosquitoes at 48 hpi.

We further examined whether the increased levels of *TEP1* expression observed in *dsCactus* mosquitoes affected the binding of *TEP1* to the ookinetes. For this we compared the timing of *TEP1* binding to parasites, and their subsequent elimination, in control and *Cactus*-deficient mosquitoes by fluorescence microscopy (Figure 5C). Depletion of Cactus resulted in rapid

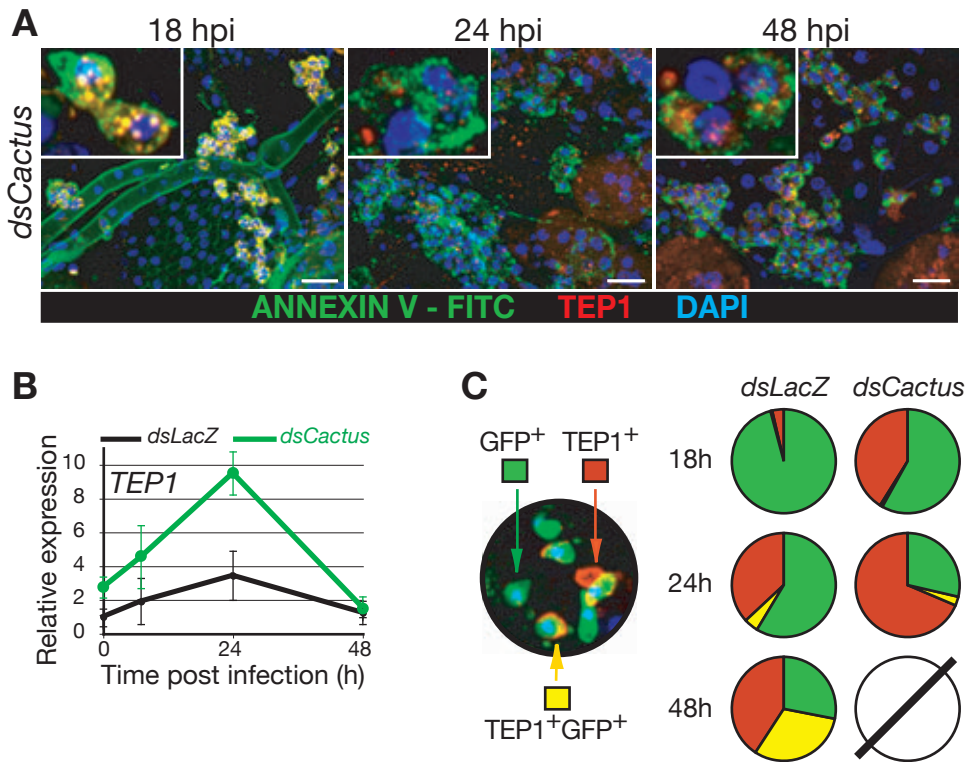


Figure 5. Cactus depletion induces expression of TEP1 in the blood cells and precocious binding of TEP1 to ookinetes in infected mosquitoes.

(A) TEP1-positive signal (red) is detected in the hemocytes attached to the mosquito abdominal cuticles stained with annexin V (green) at 18, 24 and 48 h after infectious feeding. *dsCactus* was injected 4 days before infection. The intensity of TEP1 signal at 18 h post infection is dramatically increased and the exposition time of the red channel is five-times shorter than in other panels. Parasite invasion at 24 h results in massive secretion of TEP1. TEP1 replenishment is observed at 48 h post infection. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars, 20 μm.

(B) *TEP1* expression levels are measured by quantitative real-time PCR at 0, 7, 24 and 48 h after an infectious feeding in *dsLacZ* and *dsCactus* mosquitoes and normalized using a mitochondrial carrier protein as described in Figure 2A.

(C) Midguts of Cactus-depleted and control mosquito were dissected 18, 24 and 48 h after an infection with GFP-parasites, fixed and incubated with a rabbit polyclonal affinity-purified anti-TEP1 antibody. Nuclei were stained with DAPI (blue). The left fluorescence image is a reconstruction of 11 optical sections (Apotome, Zeiss) and shows a microscopic field displaying GFP-positive (live, green), TEP1-positive (dead, red) and both TEP1- and GFP-positive (TEP1+GFP, dying, yellow) parasites. Parasite numbers in each class were scored and are shown as the mean percentage obtained from 4 independent experiments (5-11 midguts per experimental point).

parasite killing: already at 18 hpi, more than 40% of observed ookinetes were positive for TEP1 staining and were dead, as judged by the absence of GFP expression. Strikingly, at that time point only 4% of the observed ookinetes in control mosquitoes were labeled with TEP1. The differences in parasite killing rate between *dsCactus* and controls persisted until 24 hpi. By 48 hpi, we were unable to detect live or dead parasites in the *dsCactus* mosquitoes, suggesting that all parasites were killed and cleared before they could establish an infection and transform into young oocysts.

Boosting the Rel1-dependent basal immunity totally blocks *P. berghei* development in *A. gambiae*

We next scored fluorescent developing oocysts on dissected midguts 10 days after infection. Strikingly, parasite development was completely aborted in *dsCactus* mosquitoes with no live parasites detectable (Figure 6A and B, compare *dsLacZ* and *dsCactus*). Some dead ookinetes were covered with melanin (melanized ookinetes) but their numbers were significantly lower than the number of live parasites observed in controls (Figure 6A, black arrowheads, and Table 1). The melanization phenotype resembled that of Rel2 knockdown, suggesting that the ankyrin domain-containing proteins Rel2 and Cactus negatively regulate activation of melanization reactions.

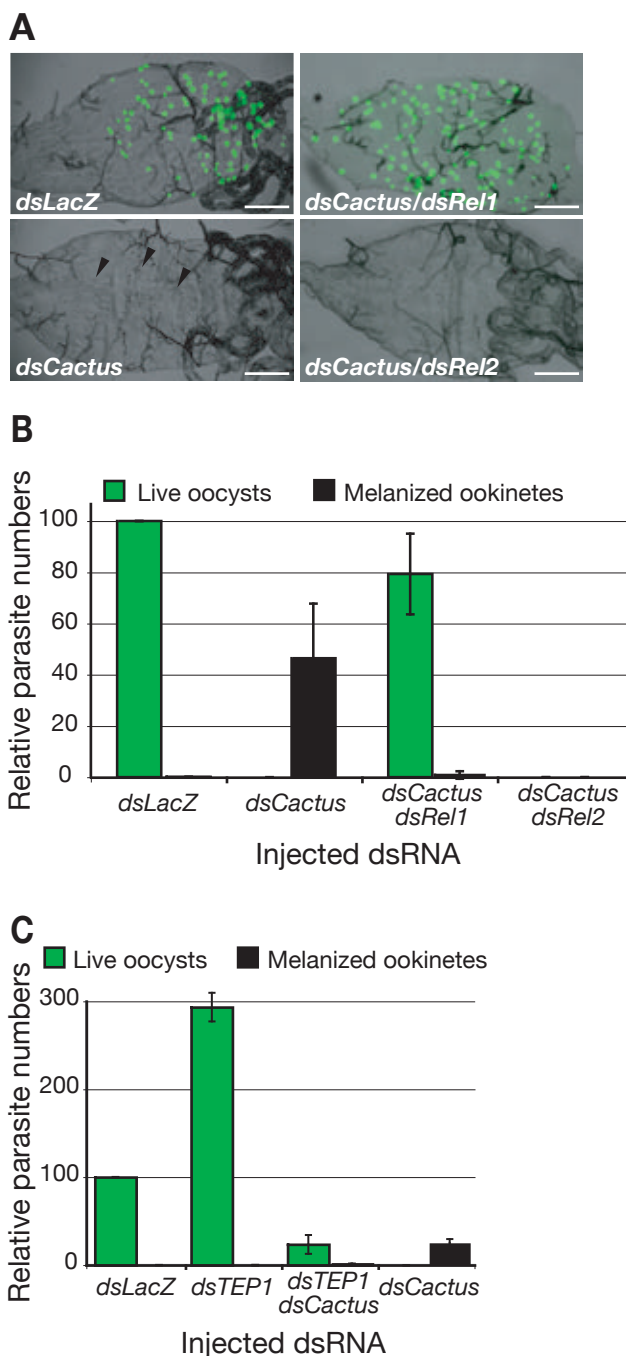


Figure 6. Depletion of I- κ B/Cactus completely aborts *P. berghei* development in *A. gambiae*.

Survival of *P. berghei* parasites in control *dsLacZ*, Cactus depleted (*dsCactus*), and in double *dsCactus/dsRel1*, *dsCactus/dsRel2* and *dsCactus/dsTEP1* mosquitoes. Females were infected 4 days after injection of dsRNA and midguts were dissected 10 days later, and fixed. GFP-expressing oocysts and melanized ookinetes were scored.

(A) Representative overlay images of bright field and GFP-channel of dissected midguts showing parasite development in the dsRNA-injected mosquitoes. Black arrowheads point to melanized ookinetes in *dsCactus*. Note the absence of melanized parasites in double *dsCactus/dsRel2* mosquitoes. Scale bars, 250 μ m.

(B) Development of GFP-expressing parasites is completely blocked in the *Cactus*-deficient background. Concomitant depletion of Rel1 but not of Rel2 rescues parasite survival in mosquitoes injected with *dsCactus*.

(C) Silencing of *TEP1* in the *Cactus*-deficient background only partially rescues parasite survival.

(B and C) Mean numbers of developing parasites per group (8 to 28 mosquitoes) in each experiment (2-3 independent experiments) were expressed relative to the mean number in the corresponding *dsLacZ* group. Graphs show relative parasite numbers and standard deviations.

Experiment	dsRNA	Midguts (n)	Prevalence (%)	Live oocysts (mean /range)	Melanized ookinetes (mean /range)
1	<i>dsLacZ</i>	19	100	94 / 9 - 273	0 / 0 - 0
	<i>dsCactus</i>	12	0	0 / 0 - 0	33 / 0 - 127
2	<i>dsLacZ</i>	18	66	32 / 0 - 151	0 / 0 - 0
	<i>dsCactus</i>	26	0	0 / 0 - 0	8 / 0 - 51
3	<i>dsLacZ</i>	15	80	39 / 0 - 165	0 / 0 - 2
	<i>dsCactus</i>	18	0	0 / 0 - 0	19 / 0 - 123

Table 1. Parasite survival in control (*dsLacZ*) and Cactus depleted (*dsCactus*) mosquitoes.

Mosquitoes were injected with dsRNA and 4 days later infected with GFP-expressing *P. berghei*. Fluorescent oocysts were counted on the dissected midguts 10 days post infection. Results of three independent experiments are shown.

To address the identity of the partner of Cactus in parasite killing, we co-injected *dsCactus* with either *dsRel1* or *dsRel2*. The co-injection of *dsRel1* totally reversed the *dsCactus* phenotype and resulted in parasite survival at a level close to that of control mosquitoes (Figures 6A and 6B). In contrast, *dsRel2* had no effect on parasite survival in the *Cactus*-deficient background. These data establish that boosting of the Rel1-mediated facet of basal immunity is sufficient to completely abort parasite development in the midgut. Surprisingly, we did not detect any melanized parasites in the double knockdown *dsCactus/dsRel2* mosquitoes. The regulation of melanization reactions appears to be complex as the depletion of a single ankyrin domain-containing protein is sufficient to activate melanization of dead parasites, whereas this reaction is aborted in mosquitoes depleted for both factors.

The data presented so far indicate that Cactus depletion causes parasite killing and that TEP1 is required for this process. We further examined whether depletion of TEP1 could reverse the *Cactus*-deficient phenotype and rescue development of the parasites. As shown in Figure 6C, *TEP1* knockdown alone increases by three-fold the number of surviving parasites, confirming our earlier results (Blandin et al., 2004). In the *Cactus*-deficient background, silencing of *TEP1* rescued parasite development and abolished parasite melanization, but the number of live parasites was still four-fold lower than in the control *dsLacZ* mosquitoes (Figure 6C). These results indicate that TEP1 is not the only molecule which mediates parasite killing in *dsCactus* mosquitoes. We conclude that Cactus/Rel1-dependent basal immunity relies on more than one killing mechanism, and that these mechanisms collaborate to abort *Plasmodium* development.

Discussion

The data presented in this study establish a crucial role of NF- κ B proteins Rel1 and Rel2 in the regulation of expression of a key antiparasitic factor, *TEP1*. However, contrary to our initial expectation, this role is exerted primarily in anticipation of the infection and is not directly infection-dependent. Although *Plasmodium* infection induces up-regulation of *TEP1* expression, we propose that this up-regulation during the post-infection period is not directly involved in parasite killing (see below).

In view of our results, it will be convenient in the context of *Plasmodium* infection to separately consider pre-invasion and post-invasion layers in the antiparasitic response of *Anopheles*. The pre-invasion layer is characterized by a basal level of expression of *TEP1* (and probably of other genes), which is regulated by both Rel1 and Rel2. The proteins produced during this phase are poised to encounter invading parasites and will determine the basal level of constitutive protection. We assume that the players of this basal immunity, exemplified here by *TEP1*, are permanently in circulation in the hemolymph and come into contact with the parasites once they have reached the basal side of the midgut epithelium. Our previous study showed that *TEP1* binds to the invading ookinetes and mediates, through an as yet unknown mechanism, killing of the parasite (Blandin et al., 2004). The results reported here further indicate that *TEP1* is depleted from the blood cells during the invasion period and is replenished following active transcriptional induction during the post-invasion phase. This replenishment is NF- κ B independent and its control at the transcriptional level remains unclear. The analysis of the *TEP1* promoter region revealed the presence of several motifs which could be recognized by other transcriptional factors including STATs, GATA and Forkhead. Further studies will determine the nature of the post-invasion regulation of *TEP1* expression.

Our results lead us to propose a crucial role for basal immunity in the antiparasitic response of *A. gambiae*. This conclusion is based on two major observations: (i) decreasing the level of basal immunity results in a two-fold increase in the number of parasites developing in the mosquito midgut; (ii) boosting the basal immunity completely blocks parasite development. In both cases, the modulation of the basal immunity, exemplified here by *TEP1* expression, was achieved through depletion of the NF- κ B/I κ B family members. Silencing of *NF- κ B/Rel1* and *Rel2* decreased the basal level of *TEP1* expression by 4-fold, whereas depletion of *I κ B/Cactus* resulted in a 3-fold transcriptional induction of *TEP1*.

The full abortion of parasite development by manipulating a single component of an immune cascade has not been reported so far, to the best of our knowledge. The simple and robust

experimental procedure which we describe here, provides a powerful model to dissect the molecular and cellular mechanisms that govern parasite killing. As pointed out by this study and in our previous work, *TEP1* is a crucial player in the killing process. However, the results obtained in the double *dsCactus/TEP1* knockdown mosquitoes clearly show that other molecules must contribute to the parasite killing. One candidate is the antiparasitic protein *LRIM1* identified by Osta and collaborators (Osta et al., 2004). Of note, in our control experiments for *TEP1* expression, we observed that during the pre-invasion phase expression of *LRIM1* was regulated by NF- κ B in a manner similar to that of *TEP1*. In contrast, we observed that the *Plasmodium*-induced *LRIM1* up-regulation was NF- κ B dependent (C.F., unpublished results). This observation was not investigated further. If, and how other proteins contribute to the NF- κ B induced parasite killing in the early phases of infection are among the most challenging questions facing the vector biology field, and we believe that the *dsCactus* model should greatly facilitate further studies in this respect.

We have yet to determine how the activities of the Rel proteins are regulated during the pre-invasion phase. Constitutive expression of NF- κ B dependent genes have been reported in other systems (see Tergaonkar et al., 2005, and references therein). At present, our understanding of the intracellular signaling cascades which are potentially involved in NF- κ B activation in *Anopheles* are too fragmentary to warrant a meaningful discussion. Suffice it to say, the components of the Imd pathway in *Anopheles*, namely Rel2 and Imd itself, are required for resistance of the mosquitoes to bacterial infections as the Rel2-dependent survival to microbial infections is compromised in *dsImd* and *dsRel2* knockdowns (Meister et al., 2005). Furthermore, survival of adult mosquitoes after fungal infections is compromised in *dsRel1* context (C.F., unpublished results). These results are compatible with the proposal that *Anopheles* can regulate NF- κ B dependent immune responses *via* signaling cascades equivalent to the well established Toll and Imd pathways of *Drosophila*. Constitutive expression of NF- κ B dependent genes has not been formally reported in *Drosophila*, but most of the studies in the fruitfly were centered on the strongly inducible antimicrobial peptides and may therefore have missed a constitutive facet. Moreover, the immune responses are often tailored to the nature of invading microorganisms. The life cycles and *modus operandi* differ dramatically within and between bacterial, fungal and protozoan species. Our previous results suggested that neither oocysts nor sporozoites are sensitive to the *TEP1*-mediated killing (Blandin et al., 2004). Here we extend this observation and note that *Cactus* depletion after infection has no effect on oocyst development (C.F., data not shown). Based on these observations, we posit that the mosquito antiparasitic responses,

as illustrated here by TEP1, are lethal to the parasite during a very short window of time. This period extends from the time of the first contact of the ookinete with the mosquito blood on the basal side of the midgut to the transformation of the ookinete into an oocyst, probably covering not more than a couple of hours in the case of an individual ookinete.

Finally, it is of interest to note that in the study of Meister et al. (Meister et al., 2005), knockdown of *Rel2* resulted in a two-fold increase in the load of midgut parasites. In our *Rel2* depletion studies, we were unable to detect any significant change in parasite numbers. As different strategies were used for *Rel2* silencing (see Materials and methods), further experiments will be needed to resolve this apparent discrepancy.

In conclusion, our study reveals that a constitutive NF- κ B dependent synthesis of a complement-like protein in the blood cells prior to infection plays a crucial, though not unique role in killing invading parasites at the basal side of the midgut. The potentials of this basal defense are dramatically highlighted by the observation that boosting the defense through knockdown of the inhibitor protein I κ B/Cactus renders mosquitoes totally refractory to the *Plasmodium* parasites.

Experimental Procedures

dsRNA production and silencing. *Cactus* Eco RI – Hind III 713-bp long fragment was cloned from the EST library (Dimopoulos et al., 2000) clone 4A3A-AAT-A-11 into pLL10 vector, resulting in pLL139. *Rel1* fragment was PCR amplified from the cDNA phage library (Arca et al., 1999) with primers AG165 (5'-AAAAAGCAGGCTGCAACAGAACCCGTTCAACT-3') and AG166 (5'-AGAAAGCTGGGTGAATGGATGCTTACGGGCTA-3') and cloned into pGEM®-T Easy Vector (Promega), then subcloned as a 680-bp long Sst II-Pst I fragment into pLL10 resulting in pLL142. *Rel2* fragment was amplified from cDNA templates prepared from *P. berghei*-infected mosquitoes (G3 strain) with primers AG161 (5'- AAAAAGCAGGCTGCAACAGCAGCAACAAC ATC-3') and AG162 (5'- AGAAAGCTGGGTACAGGCACACCTGATTGAG-3') and cloned into pGEM®-T Easy Vector (Promega), then subcloned into pLL10 as a 760-bp long Sst II-Pst I fragment, producing pLL164. Plasmids pLL10, pLL17 (*dsTEP1*) and pLL100 (*dsLacZ*), and the synthesis of dsRNAs were as previously described (Blandin et al., 2004; Franke-Fayard et al., 2004). Female 1-day old mosquitoes were injected with 0.2 μ g of dsRNA using a Nanoject II injector (Drummond). Co-injection experiments were performed by injecting a double-volume of 1:1 mixtures of 3 μ g/ μ l solutions of dsRNAs. As *Rel2* was reported to be encoded by at least two alternatively spliced forms (Meister et al., 2005), dsRNA targeting sequences encoding both *Rel*-homology and ankyrin-repeat domains were used to knockdown all isoforms. Effect of silencing

on gene transcriptional expression was analyzed 6 h after dsRNA injection by quantitative real-time PCR (Supplementary Table 1).

Phenotypic analysis of dsRNA-injected mosquitoes. *Anopheles gambiae* G3 strain rearing and maintenance was carried out at 28°C, 75-80% humidity, 12/12 h light/dark cycle. In each infection experiment, mosquitoes were fed on anaesthetized ICR mice that had been infected either with the *P. berghei* GFP-con 259cl2 or with 2.34 clones (Franke-Fayard et al., 2004). Parasitaemia in mice was assayed by Diff-Quik I-stained blood smears for proportion of infected red blood cells and differentiated gametocytes and by a FACS analysis of GFP-parasites (10000 red blood cells per an infected mouse). Mosquito midguts were dissected 18, 24, 48 h and 10 days after infection and fixed in 4% paraformaldehyde. Immunofluorescence analysis was as previously described (Blandin et al., 2004). Parasite numbers were scored using a Zeiss fluorescence microscope (Axiovert 200M) equipped with a Zeiss Apotome module. Images were reconstructed and analyzed using an Axiovision 4.4 software (Zeiss). For immunoblotting, hemolymph protein extracts from 15 mosquitoes were separated using 6% SDS-PAGE. Protein transfer and antibody incubations were performed as previously described (Levashina et al., 2001).

Hemocytic microscopic analysis. Hemocytes were labeled with FITC-conjugated Annexin V. Dissected abdominal cuticles were incubated for 10 min in 50 µl of Annexin-V-FLUOS labeling solution (Roche Diagnostics GmbH), briefly washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. After PBS washes and incubation with anti-TEP1 polyclonal antibody (1/300) as previously described (Levashina et al., 2001), preparations were stained with DAPI and analyzed using Zeiss microscope equipped with the Apotome module. The localization of TEP1 and annexin-V and the intensity of TEP1 signal was monitored on the reconstructed images using Axiovision 4.4 software (Zeiss). Exposition time in each experiment was set up to the time calculated for the strongest TEP1 signal, except for *dsCactus* 18 h post infection, where 5-fold lower time was used to avoid signal overexposure.

Quantitative real-time PCR. Total RNA of 10 mosquitoes was extracted with Trizol® reagent (Invitrogen) at different time points after injection of dsRNA and 2 µg of total RNA was reverse transcribed using M-MLV enzyme and random primers (Invitrogen). Specific primers were designed using PrimerSelect (DNA Star™).

Cactus: forward AG211 (5'-GAACGGCTGCGCTTTAACA-3'), reverse AG212 (5'-TCGTTCAAGTTCTGTGCAAGTGT-3');

Rel1: forward AG221 (5'-TCAACAGATGCCAAAAGAGGAAAT-3'), reverse AG222 (5'-

CTGGTTGGAGGGATTGTG-3');

Rel2: forward AG225 (5'-CGGGCAGAGGGAAGCAT-3'), reverse AG226 (5'-AGGCCCGCTCACCGTT-3');

Cecropin1: forward AG374 (5'-CCAGAGACCAACCAACCACCAA-3'), reverse AG375 (5'-GCACTGCCAGCACGACAAAGA-3');

Cecropin3: forward AG376 (5'-GTGCGCCGCGGTGGAAGT-3'), reverse AG377 (5'-AATGACGGGCAGCGCTTTCTTAG-3');

Defensin1: forward AG372 (5'-CATGCCGCGCTGGAGAACTA-3'), reverse AG373 (5'-GATAGCGGCGAGCGATACAGTGA-3');

Gambicin: forward AG378 (5'-GTTTGCTTACGCGCCGACTTGT-3'), reverse AG379 (5'-AAACGCCCTCCGGTTGAGATAG-3').

MC: forward AG280 (5'-CTTTCGCATTTCGACCCTATCA-3'), reverse AG281 (5'-CAATGCACCGCTACAGGATG-3').

A gene encoding a mitochondrial carrier (MC) protein (ENSANGP00000020264) was used as an internal control in all experiments involving infectious feeding. In contrast to *rpS7*, expression of this gene is not affected by *Plasmodium*. *TEP1* and *rpS7* (internal control for non-infectious experiments) primers were as previously reported (Blandin et al., 2004; Michel et al., 2005; Osta et al., 2004). The PCR reactions were assembled using iQTMSYBR[®] Green Supermix and run on an iCycler (BioRad) according to the manufacturer's instructions.

References

- Arca, B., Lombardo, F., de Lara Capurro, M., della Torre, A., Dimopoulos, G., James, A. A., and Coluzzi, M. (1999). Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1516-1521.
- Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J. A., and Kafatos, F. C. (1996). Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *EMBO J* 15, 4691-4701.
- Blandin, S., and Levashina, E. A. (2004). Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr Opin Immunol* 16, 16-20.
- Blandin, S., Moita, L. F., Köcher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C., and Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the *Defensin* gene. *EMBO Rep* 3, 852-856.
- Blandin, S., Shiao, S. H., Moita, L. F., Janse, C. J., Waters, A. P., Kafatos, F. C., and Levashina, E. A. (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 116, 661-670.
- Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., Collins, F. H., Danielli, A., Dimopoulos, G., et al. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159-165.
- Dimopoulos, G., Casavant, T. L., Chang, S., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Schultz, J., Benes, V., Bork, P., Ansorge, W., et al. (2000). *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: Identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6619-6624.
- Dimopoulos, G., Christophides, G. K., Meister, S., Schultz, J., White, K. P., Barillas-Mury, C., and Kafatos, F. C. (2002). Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge,

and malaria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8814-8819.

Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R. E., Waters, A. P., and Janse, C. J. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 137, 23-33.

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

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

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.

Meister, S., Kanzok, S. M., Zheng, X. L., Luna, C., Li, T. R., Hoa, N. T., Clayton, J. R., White, K. P., Kafatos, F. C., Christophides, G. K., and Zheng, L. (2005). Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11420-11425.

Michel, K., Budd, A., Pinto, S., Gibson, T. J., and Kafatos, F. C. (2005). *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* 6, 891-897.

Osta, M. A., Christophides, G. K., and Kafatos, F. C. (2004). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 303, 2030-2032.

Sinden, R. E. (2002). Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol* 4, 713-724.

Tergaonkar, V., Correa, R. G., Ikawa, M., and Verma, I. M. (2005). Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity. *Nat Cell Biol* 7, 921-923.

Acknowledgments

S.B. and E.A.L. express their gratitude to F.C. Kafatos for long-standing support and interest. The authors thank H.-M. Müller for a gift of the PPO antibody. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UPR 9022), the Institut National de la Recherche Medicale (INSERM "Avenir" to E.A.L.), the French Ministry of National Education and Research (ACI "Jeunes Chercheurs" to E.A.L. and AMN to C.F.), the Fondation Schlumberger (FSER to E.A.L.), the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM to E.A.L.), the European Commission FP6 (Networks of Excellence "BioMalPar" to E.A.L. and J.A.H.) and the National Institutes of Health (2P01AI044220-06A1 to J.A.H.). E.A.L. is an international research scholar of the Howard Hughes Medical Institute. S.B. is a Long-Term EMBO fellow. M.T. is supported by the Ministry of Culture, Education and Research, CRP-Santé, Luxembourg.

Injected dsRNA/Genes	<i>Cactus</i>	<i>Rel1</i>	<i>Rel2</i>	n
<i>dsLacZ</i>	100,0	100,0	100,0	10
<i>dsCactus</i>	51,4 ± 16	106,2 ± 8	143,4 ± 25	10
<i>dsRel1</i>	104,2 ± 7	74,3 ± 14	113,1 ± 12	10
<i>dsRel2</i>	92,2 ± 10	80,9 ± 15	60,8 ± 18	7
<i>dsCactus/dsRel1</i>	47,9 ± 15	78,2 ± 13 *	140,2 ± 23	11
<i>dsCactus/dsRel2</i>	48,9 ± 19	102,0 ± 5	64,7 ± 18 *	7
<i>dsRel1/dsRel2</i>	101,2 ± 4	77,9 ± 17	68,7 ± 19	6

Table S1. Quantitative real-time PCR-based estimations of effect of RNAi silencing on levels of the targeted gene expression 6 h after injection of dsRNA.

Levels of gene expression in the samples marked with an asterisk were compared to the level of expression in *dsCactus* mosquitoes; n, number of experiments.

Nous avons démontré en utilisant comme marqueur le gène *TEP1*, qu'une part importante des défenses de l'anophèle contre le parasite *P. berghei* est constituée par une immunité que nous avons qualifiée de basale, c'est à dire déjà présente avant l'infection. Les gènes constituant cette immunité basale sont régulés par les facteurs de type NF-κB Rel1 et Rel2 et peuvent être artificiellement induits via la suppression du régulateur négatif de type IκB, Cactus. La démonstration du rôle de l'immunité basale dans la réponse contre le parasite *P. berghei* est illustrée par le fait que l'invalidation conjointe de *Rel1* et *Rel2* se traduit par une augmentation de la permissivité de *A. gambiae* vis à vis de *P. berghei* alors que l'invalidation de *Cactus* rend les anophèles réfractaires à *P. berghei*.

III.2. Données complémentaires

L'ensemble des expériences présentées dans le manuscrit ont été conduites en utilisant comme gène marqueur de l'infection par *P. berghei* le gène *TEP1*. En effet, ce gène connu et étudié depuis longtemps (Levashina *et al.*, 2001) (Blandin *et al.*, 2004) présente l'avantage d'être bien caractérisé et des anticorps dirigés contre la protéine TEP1 sont disponibles au laboratoire. Cependant, quand nous le pouvions, nous avons aussi réalisé les expériences présentées avec d'autres gènes connus pour interférer avec le développement du parasite *P. berghei*, *LRIM1* (Leucine Rich repeat IMmune gene 1), *CTL4* (C-Type Lectin 4) (Osta *et al.*, 2004) et *SRPN2* (Serpine 2) (Michel *et al.*, 2005).

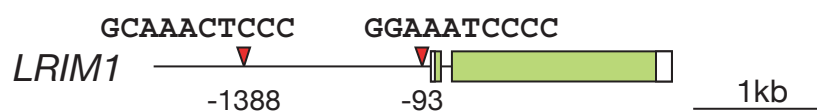


Figure III.3. Le promoteur de *LRIM1* contient deux sites de liaison aux facteurs de type NF-κB.

Le promoteur du gène *LRIM1* a été analysé et il contient comme celui de *TEP1* des sites de liaison pour des facteurs NF-κB (figure III.3). Nous avons pu vérifier par PCR quantitative en temps réel que *LRIM1* est induit 24 h après l'infection par *P. berghei* (figure III.4.a). Cependant, contrairement à ce que nous avons observé pour *TEP1*, cette induction dépend fortement du facteur de transcription Rel2 mais aussi de Rel1 dans une moindre mesure (figure III.4.a). Nous avons par la suite voulu vérifier si comme pour *TEP1*, les facteurs de type NF-κB Rel1 et Rel2 sont impliqués dans la transcription basale de *LRIM1*. Nous avons pu observer que comme dans le cas de *TEP1*, l'invalidation conjointe de *Rel1* et *Rel2* provoque une diminution conséquente de la production de transcrit pour *LRIM1* (figure III.4.b).

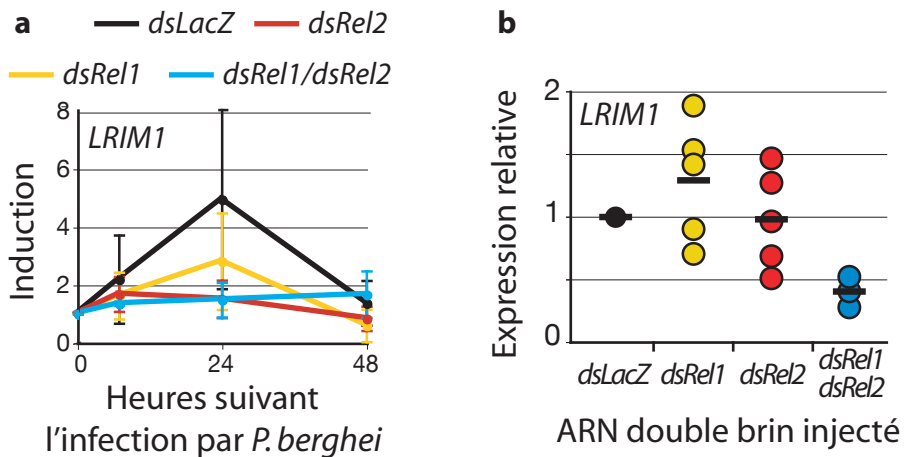


Figure III.4. a. Induction de *LRIM1* suite à l'infection par *P. berghei* après l'inactivation de *Rel1*, *Rel2* ou *Rel1* et *Rel2*. L'expression de *LRIM1* après l'infection par *P. berghei* est contrôlée par *Rel2* et dans une moindre mesure, *Rel1*. **b. Niveau basal d'expression de *LRIM1* 4 jours après l'injection d'ARN double brin spécifique de *LacZ* (contrôle), *Rel1*, *Rel2* ou *Rel1* et *Rel2*.** Le niveau basal de transcription de *LRIM1* est dépendant de *Rel1* et *Rel2*.

Le même type d'analyse a été conduit avec *CTL4* et *SRPN2*. Ces deux gènes sont faiblement (*CTL4*) ou pas (*SRPN2*) induits suite à l'infection et aucune différence significative entre les différentes invalidations de gènes (*Rel1* et/ou *Rel2*) n'a été observée, que ce soit au niveau de leur expression basale ou de la régulation de la transcription suite à l'infection (figure III.5).

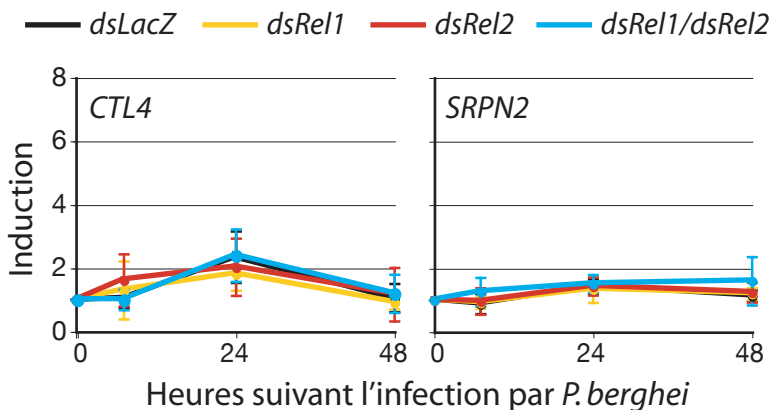


Figure III.5. Induction de l'expression de *CTL4* et *LRIM1* après l'infection par *P. berghei*. L'expression de *SRPN2* n'est pas induite par l'infection et dans les deux cas, l'inactivation de *Rel1* ou *Rel2* ne modifie pas significativement les profils d'expression.

Nous avons ensuite voulu observer si l'inactivation de *Cactus* modifiait la transcription des gènes *LRIM1*, *CTL4* et *SRPN2*. De même que pour *TEP1*, nous

avons pu observer que l'inactivation de *Cactus* entraîne une forte induction transcriptionnelle de *LRIM1* et *CTL4*, sous le contrôle de Rel1 (figure III.6). Cette induction est moins marquée dans le cas de *SRPN2* et l'inactivation conjointe de *Rel1* ou *Rel2* ne donne pas de différence significative dans ce dernier cas.

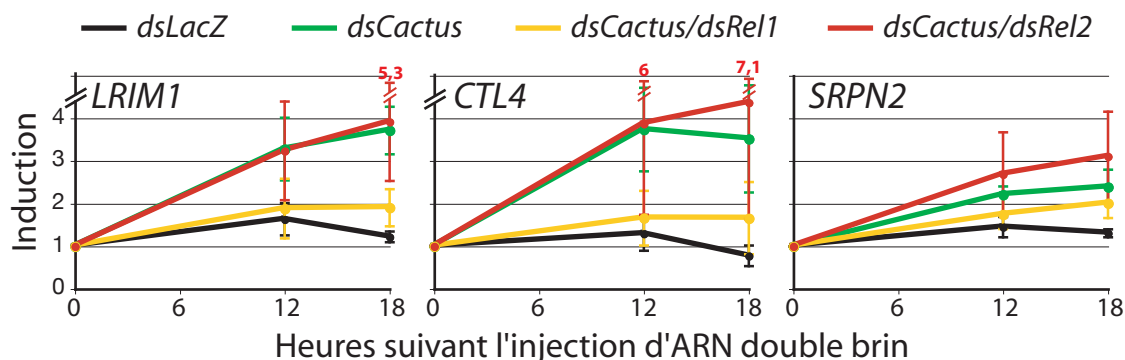


Figure III.6. Effet de l'inactivation de *Cactus* sur l'expression de gènes de l'immunité. 12h après l'inactivation de *Cactus* on observe l'induction de *LRIM1* et *CTL4* sous le contrôle de Rel1. Dans le cas de *SRPN2*, cette induction est moins marquée.

Nous avons montré que l'inactivation conjointe de *Rel1* et *Rel2* entraîne une diminution de la quantité basale de *LRIM1*. Cependant, suite à l'infection par *P. berghei*, *LRIM1* n'est pas régulé comme *TEP1* puisqu'il est majoritairement sous le contrôle de Rel2. Ces résultats montrent que le contrôle de l'activité transcriptionnelle basale de gènes impliqués dans les réponses antiparasitaires par Rel1 et Rel2 n'est pas restreint à *TEP1*. De plus ils démontrent que plusieurs voies de signalisation sont à l'origine de l'activation transcriptionnelle observée 24 h après l'infection par *P. berghei*. Enfin, l'inactivation de *Cactus* provoque non seulement l'induction de *TEP1*, mais aussi celle de *LRIM1* et *CTL4*, sous le contrôle de Rel1, ce qui confirme que la cassette *Cactus/Rel1* joue un rôle central dans l'activation de la transcription suite à l'inactivation de *Cactus*. Il est intéressant de noter que *LRIM1* est comme *TEP1* impliquée dans des mécanismes de défense contre *P. berghei* alors que *CTL4* a un effet contraire sur la survie des parasites. En effet, son inactivation entraîne une diminution du nombre d'oocystes présents et une mélanisation massive des ookinètes. Ainsi la cassette *Cactus/Rel1* contrôle vraisemblablement la transcription d'un ensemble de gènes aux propriétés diverses vis à vis du parasite *P. berghei*, le phénotype observé au final étant le résultat de la combinaison de ces différents effets.

III.3. Discussion

Nous avons démontré dans ce chapitre le rôle fondamental des protéines de type NF- κ B dans la régulation de l'immunité basale. Nous avons pu observer que l'invalidation des gènes codant pour les facteurs de type NF- κ B Rel1 et Rel2 entraîne une susceptibilité accrue des anophèles à l'infection par *P. berghei*, sensibilité corrélée avec l'expression diminuée de deux transcrits importants de la réponse antiparasitaire, *TEP1* et *LRIM1*. Nous avons démontré que l'invalidation de *Cactus* bloque le développement des parasites via le facteur de transcription Rel1 et que ce blocage est corrélé avec une augmentation de l'expression des transcrits de *LRIM1*, *TEP1* et *CTL4*. A la suite de ces résultats, nous faisons l'hypothèse que les protéines NF- κ B sont responsables chez l'anophèle du maintien d'un certain niveau d'immunité que nous avons appelé immunité basale, et qui joue un rôle lors d'une invasion par *P. berghei* pour limiter la progression des ookinètes dans les premiers temps de l'infection. Ceci est un mécanisme qui évoque les mécanismes de type complément chez les mammifères, dont le principe est de disposer d'une certaine quantité de molécules sentinelles en permanence dans la circulation. Ces molécules sont capables de se fixer spécifiquement sur les pathogènes afin de limiter rapidement une infection.

Dans ce chapitre, nous avons essayé de comprendre pourquoi l'invalidation de *Cactus* rend les anophèles réfractaires à *P. berghei*. La suite des travaux qui ont été réalisés vise à ouvrir des perspectives pour comprendre comment l'invalidation de *Cactus* modifie les interactions entre l'anophèle et le plasmodium. Nous avons recherché les cibles de la cassette Cactus/Rel1 et mesuré l'effet de l'invalidation de *Cactus* sur le développement d'autres espèces de plasmodium.

Chapitre IV

Perspectives offertes par l'invalidation de *Cactus* pour les recherches sur les interactions entre anophèle et plasmodium

Nous avons démontré dans le chapitre précédent que la défense d'*A. gambiae* contre *P. berghei* repose principalement sur la présence permanente dans l'hémolymphe de l'anophèle d'un certain nombre de molécules aux propriétés antiparasitaires. L'absence d'une de ces protéines comme TEP1 rend les anophèles plus sensibles à l'infection. Nous avons pu montrer que l'anophèle est capable de bloquer la progression du parasite si son système immunitaire est activé au préalable par l'invalidation de *Cactus*. L'invalidation de *Cactus* entraîne l'induction d'un certain nombre de gènes (mais pas des gènes codant pour les peptides antimicrobiens par exemple). Nous avons aussi montré que TEP1 n'explique pas à lui seul l'élimination des ookinètes observée en l'absence de *Cactus*, ce qui signifie que d'autres facteurs interviennent pour bloquer le développement du parasite. L'invalidation de *Cactus* peut donc devenir un outil puissant pour trouver de nouvelles molécules impliquées dans l'élimination de *Plasmodium* par l'anophèle.

Dans ce chapitre nous allons présenter les expériences que nous avons construites pour exploiter et prolonger les résultats obtenus précédemment. Nous cherchons à répondre à plusieurs questions, notamment savoir quelles sont les molécules aux propriétés antiparasitaires encore inconnues et induites par la cassette *Cactus/Rel1*. Nous avons aussi voulu savoir si le phénotype observé après l'invalidation de *Cactus* sur la survie de *P. berghei* était observé aussi avec d'autres espèces de *Plasmodium*. En effet, le résultat de cette expérience, notamment avec le vecteur du paludisme *P. falciparum* conditionnera fortement les orientations des recherches pour le futur.

IV.1. Matériel et méthodes

IV.1.1. Réalisation des puces à ADN

Les ARN double brin dirigés contre *Cactus*, *Cactus* et *Rel1* ou *Cactus* et *Rel2* (le domaine RHD) ont été injectés à 90 femelles anophèles. De ces 90 moustiques injectés, 30 sont flash-congelés 12 h après l'injection dans l'azote liquide puis conservés à -80°C . Pour vérifier que l'injection d'ARN double brin a été efficace, 60 anophèles sont gardées pour réaliser une infection et confirmer que le phénotype sur la survie des oocystes est correct. Les expériences ont été réalisées en triplicats de manière indépendante, avec des moustiques de générations différentes et des ARN double brins fabriqués indépendamment. Une fois la vérification de l'efficacité de l'invalidation obtenue pour ces 3 expériences, les 9 tubes (3 répétitions de 3 injections différentes : *dsCactus*, *dsCactus/dsRel1* et *dsCactus/dsRel2RHD*) ont été traités en même temps. L'extraction d'ARN a été réalisée avec le kit Qiagen RNeasy® en suivant le protocole du fabricant. Avant la lyse, les échantillons sont broyés dans l'azote liquide. Les ARN sont resuspendus dans l'eau à une concentration de $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. 20 μg suffisent pour chaque puce à ADN. La suite de l'expérience a été réalisée à la plateforme de l'IGBMC par Christelle Thibault. L'intégrité et la pureté des échantillons ont été vérifiés par spectrophotométrie et par électrophorèse capillaire à l'aide du Bioanalyser 2100 et du kit RNA600 LabChip d'Agilent Technologies. L'analyse, ainsi que la normalisation des données ont été réalisées comme décrit précédemment (Irving *et al.*, 2001). Les données ont été traitées avec le logiciel GeneSpring (version 7.3) et une analyse comparative des inductions de gènes a été réalisée.

IV.1.2. Infection par *P. falciparum*

Les expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Isabelle Morlais (laboratoire OCEAC-IRD de Yaoundé) sur des enfants porteurs de gamétocytes de la région de Mfou à 30km au Sud-Est de Yaoundé. Les écoles de la zone sont criblées à tour de rôle (une école par semaine) et tous les enfants dont les parents ont donné leur accord sont testés par goutte épaisse. La goutte épaisse est un test facile à réaliser sur le terrain, il consiste à prélever une goutte de sang à l'extrémité d'un doigt à l'aide d'une lancette puis à étaler et écraser cette goutte sur une lame, afin de rompre les hématies et faire sortir les parasites. Les lames sont séchées sur place puis colorées au Giemsa et lues à Yaoundé. Le lendemain, tous les enfants porteurs de trophozoïtes qui risquent donc de développer un accès palustre dans les jours suivants sont traités à l'artésunate et paracétamol. Deux ou trois enfants porteurs de gamétocytes sont amenés à Yaoundé, une deuxième goutte épaisse est réalisée puis le nombre de gamétocytes est quantifié afin de confirmer l'analyse réalisée la veille. Le sang des enfants dont le statut de porteur de

gamétocytes est confirmé est collecté en tubes EDTA, puis centrifugé et le sérum remplacé par un sérum AB+ sain, afin de limiter les effets de l'immunité bloquant la transmission du sérum des malades (Boudin *et al.*, 2005). Le sang est transféré dans des tubes en verre maintenus à 37°C par un courant d'eau et portant un parafilm à l'extrémité afin de laisser nourrir les moustiques sur cette membrane artificielle (figure IV.1). Les moustiques utilisés lors de cette étude appartiennent à la souche Yaoundé, qui a été isolée il y a une dizaine d'années à Yaoundé et gardée depuis au laboratoire (Tchuinkam *et al.*, 1993). Les moustiques sont ensuite gardés à 28°C et 70-80% d'humidité, ceux s'étant gorgés sont triés le lendemain et conservés dans ces conditions. Les intestins sont disséqués dans le mercurochrome 0,4% et analysés 7 jours après l'infection. Le mercurochrome colore les oocystes et rend leur comptage plus aisé au microscope à transmission (objectif X40).



Figure IV.1. Gorgement des femelles anophèles sur membrane artificielle. Les tubes en verre permettant le nourrissage des anophèles sont fermés par un parafilm sur lequel se gorgent les moustiques. Un système de circulation d'eau chaude permet de maintenir le sang à 37°C.

IV.2. Résultats

IV.2.1. A la recherche des cibles du module Cactus/Rel1

IV.2.1.1. Conception des expériences, méthodologie

Nous cherchons à connaître les gènes responsables du phénotype observé après l'inactivation de *Cactus*, en particulier de la mort de tous les parasites au stade ookinète. Nous savons que ce phénotype est médié par la cassette Cactus/Rel1 et nous avons pu vérifier par PCR quantitative que l'induction après l'inactivation de *Cactus* d'un certain nombre de gènes déjà connus pour leur rôle dans la réponse immunitaire (*TEP1*, *LRIM1*, *CTL4*) dépend de Rel1. Nous recherchons donc les cibles de la cassette Cactus/Rel1 suite à l'inactivation de *Cactus*. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi de réaliser une analyse par puces à ADN qui nous permet de comparer les transcriptomes des anophèles suite aux invalidations de *Cactus* seul ou conjointement avec Rel1 ou Rel2. Les gènes qui nous intéressent sont régulés


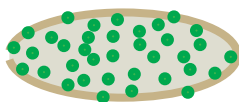

double brin injecté abréviation	phénotype oocystes	transcription des gènes régulés par:	
		Rel1	Rel2
<i>dsCactus</i> C		oui	oui
<i>dsCactus/dsRel1</i> CR1		non	oui
<i>dsCactus/dsRel2</i> CR2		oui	non

Figure IV.2. Principe de la conception des expériences réalisées par puces à ADN. 3 échantillons différents ont été comparés, l'un (C) comportant des moustiques injectés par l'ARN double brin dirigé contre *Cactus*, l'autre (CR1) comportant des moustiques injectés par deux ARN double brin dirigés contre *Cactus* et *Rel1*, et le dernier (CR2) comportant des moustiques injectés par deux ARN double brin dirigés contre *Cactus* et *Rel2*. Sur la gauche de la figure est schématisé un intestin et les oocystes (points verts), permettant de rappeler le phénotype de chacune des injections réalisées. A droite figure le principe de l'analyse des expériences, en considérant que les gènes d'intérêt peuvent être régulés par Rel1 et/ou par Rel2. Lors de l'analyse apparaîtront les effets de la transcription basale et de la transcription induite suite à l'inactivation de *Cactus* pour ces deux facteurs de transcription.

différemment entre les anophèles invalidés pour *Cactus* et ceux invalidés pour *Cactus* et *Rel1*. Les résultats de l'invalidation conjointe de *Cactus* et *Rel1* (figure 6B du chapitre III) indiquent de plus que les gènes transcrits par *Rel1* expliquent à eux seuls le phénotype observé d'élimination des ookinètes. En comparant ces deux profils transcriptionnels, on devrait pouvoir extraire l'ensemble des gènes spécifiques de cette cassette (figure IV.2). Afin d'avoir une analyse de données la plus fine possible, nous avons aussi utilisé comme contrôle les anophèles invalidés pour *Cactus* et *Rel2*. En effet, *Rel2* existe sous plusieurs formes, dont une avec un domaine RHD seul (Rel Homology Domain, le domaine d'activation de la transcription) (Meister *et al.*, 2005). Il n'est donc pas impossible que l'invalidation de *Cactus* entraîne aussi la transcription d'un certain nombre de gènes sous le contrôle de *Rel2*. Or nous savons que ces gènes ne sont pas responsables du phénotype que nous avons observé, puisque l'invalidation conjointe de *Cactus* et *Rel2* donne le même phénotype que l'invalidation de *Cactus* seul pour ce qui concerne l'absence des oocystes, qui est le processus qui nous intéresse ici (voir le chapitre III)(figure IV.2).

Pour choisir le moment auquel nous allons conduire cette expérience, nous avons analysé l'induction de gènes connus 0, 6, 12 et 18 h après l'injection d'ARN double brin (figure IV.3). On observe 6 h après l'injection d'ARN double brin que l'invalidation de *Cactus* se traduit déjà au niveau de la quantité de transcrite présent par une réduction de plus de 50% (Tableau S1, chapitre III). La piqûre provoque 6h après l'injection l'induction de *TEP1*, *LRIM1* et *CTL4*. Cet effet transitoire a disparu 12 h après l'injection, et on peut alors observer l'effet spécifique de l'invalidation de *Cactus* qui se poursuit 18 h après l'injection (figure IV.3). Nous avons donc choisi comme point de temps le point 12h.

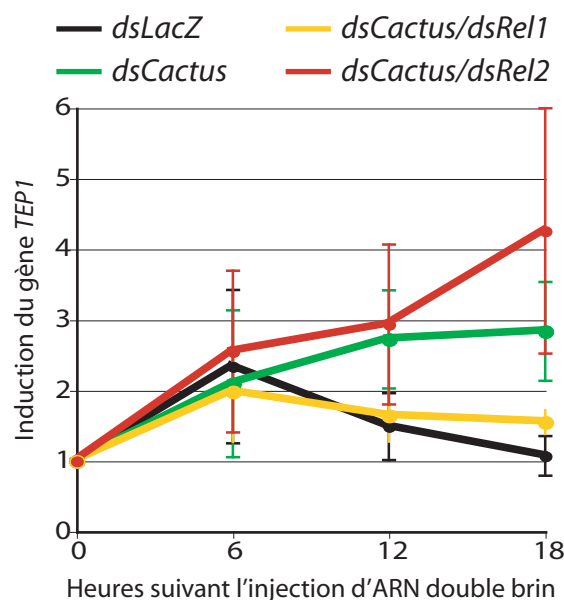


Figure IV.3. Expression de *TEP1* suite à l'injection de différents ARN double brin. On note une induction 6h après l'injection qui s'estompe à 12h dans le contrôle *dsLacZ*. Cette induction visible dans tous les échantillons est une conséquence de la piqûre réalisée pour injecter l'ARN double brin.

IV.2.1.2. Analyse bioinformatique

L'analyse des données a été réalisée dans l'esprit de conception de l'expérience. Nous avons comparé le niveau de transcription des gènes dans les 3 échantillons observés. Conformément à notre postulat de départ, pour connaître les gènes cibles de la cascade *Cactus/Rel1*, nous avons comparé d'une part l'effet de l'invalidation de *Cactus* et l'effet de l'invalidation de *Cactus*

et *Rel1* sur la transcription des gènes et d'autre part l'effet de l'inactivation de *Cactus* et *Rel2* à l'effet de l'inactivation de *Cactus* et *Rel1* (figure IV.2). Nous nous sommes pour l'instant uniquement intéressés aux gènes induits. Nous avons pu remarquer que 49 gènes sont induits d'un facteur supérieur à 2 dans les anophèles invalidés pour *Cactus* comparés aux anophèles invalidés pour *Cactus* et *Rel1*. On ne retrouve pas dans ces gènes les candidats que nous connaissons déjà : *TEP1* est induit 1,3 fois si on compare *dsCactus* et *dsCactus/dsRel1* et *LRIM1* ne varie pas significativement. Nous avons donc choisi de descendre les critères de l'analyse à 1,5 ce qui nous donne 134 gènes répondant aux deux critères : réprimés chez *dsCactus/dsRel1* par rapport à *dsCactus* et *dsCactus/dsRel2* (figure IV.4). Dans cette liste se trouvent donc en théorie tous les gènes régulés spécifiquement par la cassette *Cactus/Rel1* et impliqués dans le phénotype d'élimination des ookinètes. Afin d'utiliser au maximum les données fournies par ces expériences, nous avons aussi réalisé la liste des gènes régulés par la cassette *Cactus/Rel1*, sans tenir compte de l'expérience *Cactus/Rel2*, ce qui fait une liste de 112 gènes supplémentaires (figure IV.4).

Cette expérience nous permet aussi d'extraire d'une manière parallèle des données sur les gènes régulés par *Rel2*. La régulation des gènes par *Rel2* peut être due soit à la disparition de l'activité basale de ce facteur de transcription lorsqu'il est invalidé, soit à un contrôle direct de *Rel2* par *Cactus* comme évoqué plus haut. En procédant de la même façon que précédemment, nous avons réalisé deux listes de gènes supplémentaires (figure IV.4).

Nous avons ainsi construit quatre listes de gènes :

- Les gènes dont la transcription est régulée par la cassette *Cactus/Rel1* indépendamment de *Rel2* (tableau A.1 en annexe p. 149),
- Les gènes dont la transcription est régulée par la cassette *Cactus/Rel1* et en partie par *Rel2* (tableau A.2 en annexe p. 151),

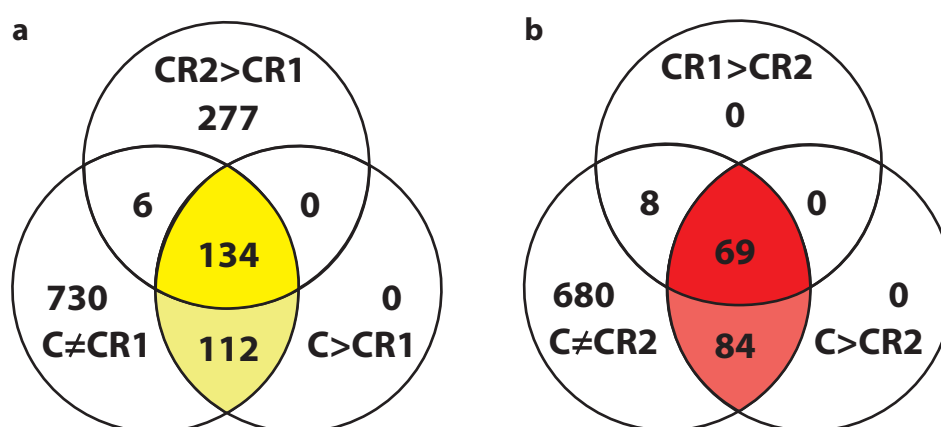


Figure IV.4. Analyse des expériences réalisées par puces à ADN. Diagrammes de Venn montrant le nombre de transcrits dont l'expression est modifiée d'un facteur supérieur à 1,5 entre les points expérimentaux considérés. **a. Nombre de transcrits dont l'expression est régulée principalement par Rel1.** **b. Nombre de transcrits dont l'expression est régulée principalement par Rel2.**

- Les gènes dont la transcription est régulée par Cactus/Rel2 ou par Rel2 indépendamment de Rel1 (tableau A.3 en annexe p. 153),
- Les gènes dont la transcription est régulée par Rel2 et partiellement par Rel1 (tableau A.4 p. 155)

De manière frappante, ces listes sont bien distinctes les unes des autres. Par exemple, dans les cibles directes de Cactus/Rel1, on retrouve 18 sérines protéases sur les 135 gènes régulés (en rose, tableau A.1). Par contre, dans les cibles de Rel2, sur 69 gènes régulés, 1 seule sérine protéase est retrouvée (en rose, tableau A.3). Les peptides antimicrobiens sont retrouvés uniquement dans les gènes cibles de Rel2 (en rouge, tableau A.3). Les résultats confirment que Rel2 est fortement régulé par la cassette Cactus/Rel1 (2,7 fois), ce que nous avons déjà observé en PCR quantitative en temps réel (voir tableau S1 du chapitre III). Dans les cibles de Rel1, on trouve aussi TEP3 et TEP9 (tableau A.1), alors que TEP4 est une cible de Rel2 (tableau A.3). Des protéines impliquées dans la reconnaissance (PGRP, GNBP) sont retrouvées essentiellement dans les cibles de Rel2 (tableau A.3). Ainsi se dessinent deux profils transcriptionnels bien distincts pour les cibles de la cascade Cactus/Rel1 et les cibles de Rel2 et/ou Cactus/Rel2 (Il faut se rappeler ici que Rel2 contrôle probablement la transcription basale de nombreux gènes, donc l'inactivation du gène codant pour Rel2 peut entraîner la diminution de la transcription d'un certain nombre de gènes, sans que cela signifie que Cactus est son partenaire).

IV.2.1.3. Les gènes indentifiés sont-ils des effecteurs de la réponse antiparasitaire induite suite à l'inactivation de *Cactus* ?

Les puces à ADN ont été conçues pour trouver de nouveaux gènes susceptibles de jouer un rôle actif dans la réponse contre *P. berghei*. Nous savons en effet que TEP1 n'explique pas à lui seul le phénotype observé (figure 6 du chapitre III), ce qui signifie que d'autres protéines sont impliquées dans l'élimination des ookinètes après l'inactivation de *Cactus*. Nous avons cloné un certain nombre de candidats pris de la liste des cibles directes de Cactus/Rel1 (tableau A.1) puis réalisé des ARN double brin. Ces ARN double brin ont été coinjectés avec *dsCactus* pour voir si l'inactivation des gènes correspondants peut restaurer le phénotype d'inactivation de *Cactus*. Ces clonages sont encore très largement en cours, mais 4 gènes candidats ont déjà été testés, ENSANGT0000009630 (candidat numéro 6 de la liste A.1, inconnu), ENSANGT00000023476 (numéro 7, inconnu), ENSANGT00000013548 (numéro 32, codant pour une sérine protéase) et ENSANGT00000014515 (numéro 83, codant pour un récepteur des LDL). Les résultats préliminaires obtenus montrent qu'aucun de ces candidats ne peut restaurer la survie même partielle des ookinètes. Ces résultats sont à confirmer et surtout, les clonages sont à poursuivre avant de tirer toute conclusion trop hâtive.

Néanmoins, dans la liste de gènes obtenue (tableau A.1), les candidats intéressants (*TEP1* et *LRIM1*) que nous connaissons n'apparaissent pas, car leur induction est assez faible. Si tous les autres gènes « intéressants » sont répartis similairement, l'analyse que nous avons réalisée n'est pas adaptée pour les extraire de la masse de données générées.

IV.2.2. Spécificité du phénotype d'invalidation de *Cactus*

IV.2.2.1. Invalidation de *Cactus* à différents stades de développement du parasite

Les expériences d'infection présentées précédemment ont toujours été réalisées 4 jours après l'injection de l'ARN double brin dirigé contre *Cactus*. Sachant que les ARN que nous supposons cible sont induits dès 12h après l'injection d'ARN double brin, nous avons essayé de réduire le temps entre l'injection et l'expérience. Nous avons donc injecté les ARN double brin spécifiques de *Cactus* 18 h avant l'infection. De la même façon que précédemment, nous avons pu observer alors une élimination complète des ookinètes. Nous n'avons pas essayé de réduire plus ce temps pour des raisons techniques. En effet, après l'injection, les moustiques sont en général assez fragilisés, et quelle que soit l'expérience, 4 jours après l'injection, les moustiques injectés prennent moins facilement un repas sanguin que les moustiques non injectés. Un temps minimal est donc nécessaire pour que les moustiques récupèrent de l'anesthésie au CO₂ et de la piqûre. Cette expérience donne un argument supplémentaire pour dire qu'il est assez peu vraisemblable que les effets observés sur le développement du parasite après l'invalidation de *Cactus* soient dûs à d'autres mécanismes que des mécanismes directs d'activation transcriptionnelle.

Nous avons aussi voulu savoir si les molécules induites par l'invalidation de *Cactus* pouvaient être actives contre d'autres stades de l'infection par le parasite. Il a été démontré précédemment par exemple que *TEP1* se lie aux ookinètes mais pas aux sporozoïtes (Blandin *et al.*, 2004). Nous avons voulu savoir si l'invalidation de *Cactus* avait un effet sur la survie des oocystes. Afin de réaliser cette expérience, nous avons injecté des anophèles quatre jours après l'infection. A ce moment là, tous les parasites sont sous la forme d'oocystes. Nous avons ensuite observé la survie des oocystes 10 jours après l'infection (6 jours après l'injection). Nous n'avons pas observé de différence par rapport aux anophèles injectés par *dsLacZ* utilisés comme contrôle. Les oocystes sont immobiles au niveau de la membrane basale et constituent probablement un stade de développement du parasite résistant aux défenses de l'hôte. Nous n'avons pas encore réalisé ce type d'expérience sur un temps plus long pour tester la capacité des sporozoïtes à rejoindre normalement les glandes salivaires dans des moustiques invalidés pour *Cactus*.

IV.2.2.2. Infection par le parasite *P. yoelii*

Nous souhaitons connaître le degré de spécificité du phénotype d'élimination des ookinètes provoqué par l'inactivation de *Cactus*. Nous possédons au laboratoire plusieurs souches de *Plasmodium* spécifiques des rongeurs. Nous avons donc réalisé une expérience d'infection avec le parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. Les parasites *P. yoelii* ne sont pas fluorescents et pour détecter les oocystes, nous avons marqué l'ADN de l'échantillon au DAPI qui permet de confirmer les images analysées en lumière visible car les oocystes présentent des structures extrêmement caractéristiques au niveau de leur ADN, dues aux nombreux sporozoïtes en développement.

Nous avons comparé des anophèles sauvages aux anophèles invalidés pour *Cactus*. Nous avons observé un développement normal des parasites en contexte sauvage (figure IV.5.a et b), avec la présence d'oocystes 10 jours après l'infection. Au contraire, après l'inactivation de *Cactus*, les parasites

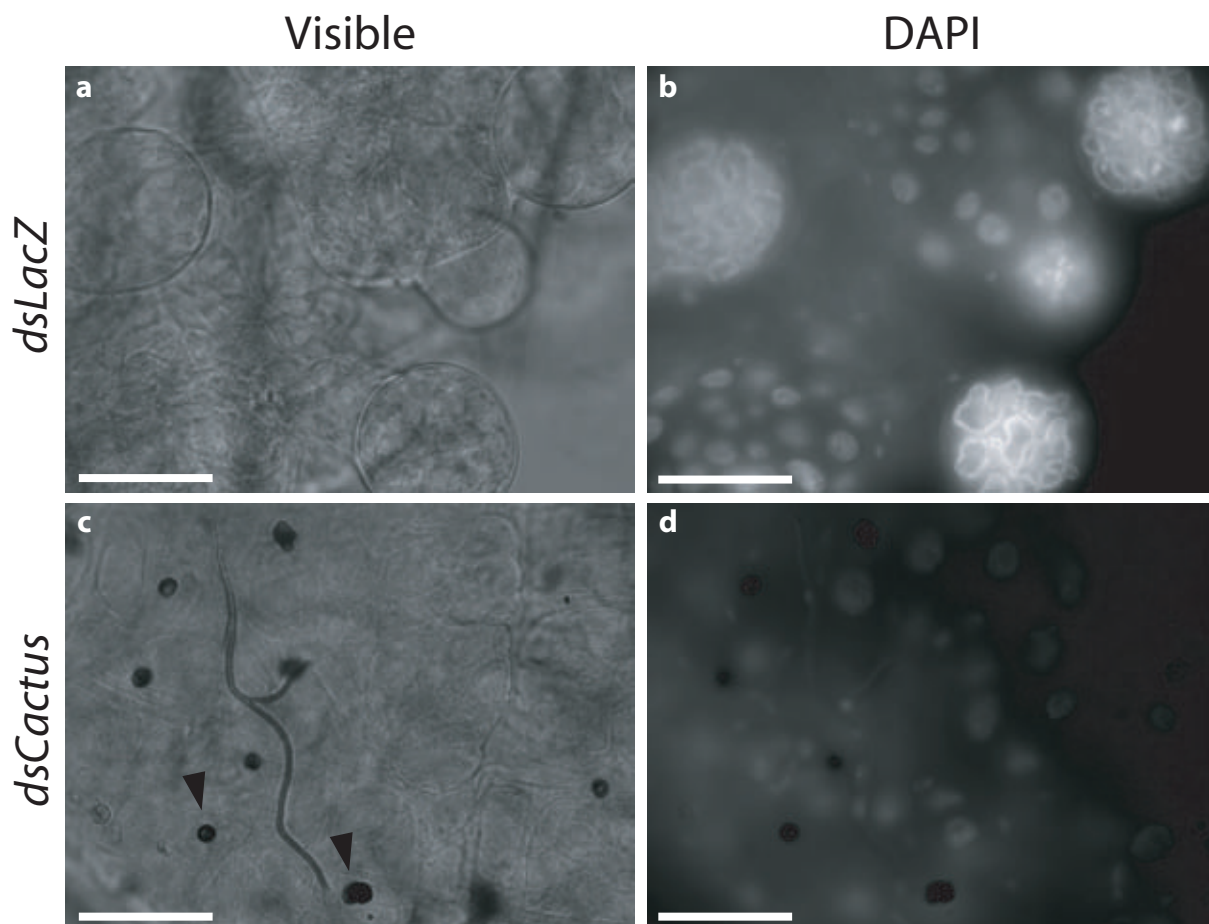


Figure IV.5. Observation des oocystes 10 jours après l'infection par *Plasmodium Yoelii*. Les oocystes sont observés en microscopie optique. Ils sont visibles grâce à leurs contours caractéristiques (a), et cette observation peut être confirmée par un marquage de l'ADN par le DAPI (b). L'ADN des oocystes présente en effet des motifs caractéristiques causés par le développement des sporozoïtes. Les moustiques ont été injectés 4 jours au préalable avec de l'ARN double brin dirigé contre *Cactus* (*dsCactus*) (c,d) ou le contrôle *LacZ* (*dsLacZ*) (a,b). Les anophèles déplétés pour *Cactus* ne présentent pas d'oocyste vivant, et des ookinètes mélanisés sont visibles (flèches noires). Echelle 50µm.

observables sont mélanisés (figure IV.5.c et d), et aucun oocyste n'est présent. Au cours de cette infection par *P. yoelii*, les parasites ont donc été éliminés au stade ookinète et mélanisés pour certains d'entre eux. Ainsi, nous réalisons lors de l'infection avec *P. yoelii* les mêmes observations qu'avec *P. berghei*, confirmant que l'invalidation de *Cactus* entraîne l'induction d'une série de gènes capables de lutter efficacement contre différentes espèces de *Plasmodium*.

Il est important de remarquer que les deux plasmodiums utilisés sont très proches, ce sont deux plasmodiums de rongeurs, leurs protéines sont identiques à plus de 88% contre 63% pour *P. falciparum* comparé à *P. berghei* (Hall *et al.*, 2005).

IV.2.2.3. Infection par *P. falciparum*

Pour poursuivre les expériences et appréhender le rôle de *Cactus* suite à l'invasion d'un anophèle par le parasite vecteur du paludisme, *P. falciparum*, une collaboration a été initiée avec le laboratoire OCEAC-IRD (Organisation de Coordination de la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale-Institut de Recherche pour le Développement) dirigé par Frédéric Simard, à Yaoundé au Cameroun. Le Cameroun est une région d'hyperendémicité du paludisme, où la transmission est stable. Cela signifie que la transmission intervient toute l'année et que toute la population est régulièrement porteuse de *P. falciparum*. Au prix d'une forte mortalité des enfants de moins de 5 ans, les adultes sont immunisés. Il n'y a donc pas d'épidémies. Deux saisons sont plus favorables à la réalisation des expériences, les mois d'avril-mai et octobre-novembre. Ces mois correspondent aux deux saisons des pluies dans la région du centre (où se situe Yaoundé). Les expériences présentées ici ont été réalisées au mois d'avril 2006 et constituent des résultats préliminaires. Il faut savoir que les infections avec *P. falciparum* ne sont pas aussi aisées qu'avec *P. berghei*, surtout en zone de transmission stable comme au Cameroun, car les charges gamétocytaires sont relativement faibles et donc les prévalences en oocystes parfois extrêmement faibles. Pour donner une illustration, sur la douzaine d'expériences réalisées, seulement 3 présentent une prévalence supérieure à 25% et sont donc utilisables.

Les expériences ont été réalisées comme précédemment en injectant l'ARN double brin 4 jours avant l'infection. Les moustiques invalidés pour *Cactus* présentent de manière répétée une prévalence plus faible en oocystes vivants que les moustiques contrôle (tableau IV.1). Cela signifie que le nombre d'intestins infectés est plus faible. Plus la prévalence des intestins contrôle est forte, plus cet effet est visible, ainsi dans l'expérience (#3, tableau IV.1) qui a donné la meilleure prévalence chez le contrôle (72%), la prévalence après l'invalidation de *Cactus* était réduite de presque 3 fois, à 26%. Par ailleurs, si on calcule le nombre moyen d'oocystes (sur tous les intestins), on observe de la même manière que l'invalidation de *Cactus* joue un rôle dans la réduction de ce nombre, effet qui est une fois de plus très marqué dans la meilleure infection où le nombre moyen d'oocystes par intestin contrôle est de 4,3 contre

	porteur	gamétocytes par μ L de sang	<i>dsLacZ</i> -comptage des oocystes				<i>dsCactus</i> -comptage des oocystes			
			n=	prévalence	moyenne	intervalle	n=	prévalence	moyenne	intervalle
exp#1 (050406)	Larissa (#17)	8,8	36	25%	0,9	0-15	23	15%	0,2	0-2
exp#2 (150406)	Elie (#419)	15,2	31	45%	0,8	0-3	29	28%	0,6	0-5
exp#3 (170406)	Christine (#458)	15,2	36	72%	4,3	0-19	38	26%	0,6	0-5

Figure IV.6. Résultats des infections exploitables réalisées avec *P. falciparum*. Les anophèles sont injectées soit avec *dsLacZ* soit avec *dsCactus* et les oocystes sont comptés 7 jours après l'infection. Le nombre d'intestin comptés (n), la prévalence de l'infection, le nombre moyen d'oocystes par intestin et les nombres minimaux et maximaux d'oocystes observés par intestin permettent d'estimer l'efficacité de l'infection.

0,6 après l'invalidation de *Cactus*. L'intervalle entre le nombre d'oocystes minimal et maximal observé par intestin pour une cohorte expérimentale est informatif lors des infections les plus fortes, car il y a alors de nombreux intestins avec plus de deux ou trois oocystes. Dans les infections faibles, ce nombre est très réduit et la comparaison du nombre d'oocystes par intestin est moins aisée à interpréter. L'expérience ayant donné la meilleure infection montrait dans les intestins contrôle de 0 à 19 oocystes contre 0 à 5 après l'invalidation de *Cactus* (tableau IV.1). Notons enfin qu'un très petit nombre d'ookinètes mélanisés (de 1 à 3 par expérience avec certitude) a pu être observé lors de chaque expérience, dans les intestins invalidés pour *Cactus*. Les résultats détaillés ici semblent donc indiquer que l'invalidation de *Cactus* a un effet sur la survie des ookinètes de *P. falciparum*. Cependant, cet effet n'est pas aussi drastique qu'avec *P. berghei* où aucun oocyste n'est observé.

IV.3. Discussion

Nous nous sommes attaché dans ce chapitre à caractériser le phénotype entraîné par l'invalidation de *Cactus* chez les anophèles. Nous avons pu démontrer que l'invalidation de *Cactus* provoque chez l'anophèle l'induction d'un ensemble de gènes spécifiquement par la cassette *Cactus/Rel1*. Ces données n'ont pas encore pu être utilisées pour trouver de nouveaux gènes impliqués dans la suppression des ookinètes, mais leur analyse apportera sans doute de nouvelles informations à ce sujet. Les puces à ADN réalisées ont permis de montrer que *Rel1* et *Rel2* contrôlent la transcription de sets de gènes distincts. De manière frappante, plus de 15% des gènes induits spécifiquement par la cassette *Cactus/Rel1* sont des sérines protéases. *Rel2* régule quant à lui l'ensemble des peptides antimicrobiens observés lors de l'analyse, ainsi que la grande majorité des gènes impliqués dans la reconnaissance des pathogènes. Cette analyse évoque les données fonctionnelles discutées préalablement (chapitre II) qui montrent que les fonctions de ces deux voies de signalisation sont distinctes, l'une étant plus particulièrement impliquée dans la réponse contre les champignons (*Rel1*) et l'autre contre les bactéries (*Rel2*). On peut ajouter qu'il avait été observé suite à l'analyse par puce à ADN du génome de la drosophile que les infections contrôlées par la voie Toll induisaient un nombre significatif de sérines protéases, alors que les bactéries à Gram négatif (associées à la voie *Imd*) entraînaient l'induction de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de défense (dont les peptides antimicrobiens) (Irving *et al.*, 2001). Les données acquises ici montrent donc une fois de plus une certaine conservation des mécanismes de l'immunité entre la drosophile et l'anophèle.

L'analyse bioinformatique réalisée pour analyser les puces à ADN est restée très sommaire et nécessite sans aucun doute d'être améliorée afin d'optimiser la détection de nouveaux candidats. L'activation basale transcriptionnelle notamment par *Rel2* a une importance que la conception des puces réalisées ne nous permet pas d'appréhender (la question biologique posée n'était pas celle ci). Partant des résultats que nous avons discutés dans le chapitre III, il serait intéressant d'établir une liste plus précise des gènes impliqués dans ce que nous avons appelé l'immunité basale. Pour réaliser cette liste, nous avons maintenant les outils nécessaires. Afin d'exagérer les contrastes de régulation transcriptionnelle et faire ressortir ainsi de manière plus évidente les candidats intéressants que nous connaissons déjà (*TEP1*, *LRIM1* par exemple) une deuxième série de puces pourrait être réalisée sur des anophèles contrôlés injectés par *dsLacZ* et des anophèles invalidés pour *Rel1* et *Rel2*. Comme notre postulat est que les gènes régulés par *Rel1* et *Rel2* au niveau basal sont pour partie identiques aux gènes induits par l'invalidation de *Cactus*, la comparaison de ces deux échantillons pourrait permettre d'extraire directement les gènes correspondant à ces deux critères et responsables des phénotypes observés sur la survie de *P. berghei*.

L'invalidation de *Cactus* entraîne des modifications du transcriptome des anophèles, suggérant fortement que les effets observés suite à cette

invalidation ont des causes multiples. Cette constatation permet de supposer que le phénotype d'élimination des ookinètes de *P. berghei* entraîné par cette invalidation sera généralisable à d'autres espèces de *Plasmodium*. A ce jour, il n'y a pas d'exemple publié de gènes ayant des effets similaires sur la réponse contre *P. berghei* et *P. falciparum*. Cela peut s'expliquer comme nous l'avons vu par la complexité de la mise en oeuvre des expériences avec *P. falciparum*, mais surtout sans doute par la forte plasticité génétique des plasmodiums et des anophèles, faisant que les interactions moléculaires qui ont lieu entre un couple anophèle-plasmodium peuvent être radicalement différentes de celles se produisant pour un autre couple. Les gènes testés jusqu'ici sont essentiellement des effecteurs qui appartiennent parfois à des familles assez larges chez l'anophèle. On peut donc aisément imaginer que si un des membres de cette famille a un rôle dans les interactions avec *P. berghei*, un autre pourra jouer ce rôle avec *P. falciparum*. *Cactus* étant un régulateur transcriptionnel, les modifications induites suite à son invalidation ne sont pas à l'échelle d'un gène mais bien à l'échelle d'un ensemble de transcrits.

L'effet de l'invalidation de *Cactus* a donc été testé sur d'autres espèces de *Plasmodium*. Nous avons pu démontrer que le phénotype d'élimination des ookinètes est confirmé lors d'une infection par *P. yoelii*. Cependant, ce parasite est aussi un parasite de rongeurs et ne présente que des différences limitées avec *P. berghei*. Nous avons donc poursuivi notre travail en étudiant l'effet de l'invalidation de *Cactus* suite à l'infection par *P. falciparum*. Nous avons pu observer une baisse significative de la prévalence suite à l'invalidation de *Cactus*. Cette baisse de prévalence est corrélée à une diminution de la quantité d'oocystes par intestin. Néanmoins les ookinètes ne sont pas totalement éliminés. Bien que cet effet ne soit pas aussi drastique qu'observé précédemment avec *P. berghei* et *P. yoelii*, il est extrêmement encourageant. Beaucoup reste à faire pour valider ces résultats, notamment, du fait des techniques et matériels disponibles au Cameroun. Le comptage sérieux des ookinètes mélanisés est quasiment impossible 7 jours après l'infection (ils se confondent avec les saletés diverses du mercurochrome, des lames, et il est impossible de prendre des photographies des expériences...), mais il serait extrêmement intéressant de réaliser des expériences d'immunohistochimie à 18, 24 et 48 h après l'infection (un peu semblables à celles présentées au chapitre III), afin de suivre le développement des ookinètes. Par ailleurs, du fait de la complexité du transport aérien des matériels scientifiques, les ARN double brins utilisés dans les expériences ont passé plus de 72 h à température ambiante. Ils ont été retestés par la suite sur *P. berghei* et n'ont pas permis d'obtenir le phénotype «habituel», et quelques oocystes vivants ont pu être observés suite à l'injection de l'ARN double brin dirigé contre *Cactus* utilisé dans les expériences présentées. Ainsi le phénotype observé sur *P. falciparum* traduit-il peut être simplement la mauvaise qualité des ARN injectés. Les expériences seront donc à reproduire, pourquoi pas en injectant une quantité supérieure d'ARN double brin dirigé contre *Cactus* afin d'aggraver le phénotype d'élimination observé avec *P. falciparum* et de limiter

les effets de la dégradation des échantillons lors du transport. Par ailleurs, pour valider notre hypothèse de travail présentée au chapitre III et l'étendre à l'infection par *P. falciparum*, il serait extrêmement intéressant maintenant d'invalidier *Rel1* et *Rel2* afin de voir si de même qu'avec *P. berghei*, cela facilite le développement des ookinètes.

Perspectives

Au début de ce travail, certains effecteurs du système immunitaire de l'anophèle étaient connus. On savait notamment que l'anophèle déclenche une réponse immunitaire suite à l'invasion par le parasite *P. berghei*. Nous avons voulu poser la question de la régulation des réponses immunitaires de l'anophèle. Les questions que nous avons posées au début de cette thèse étaient les suivantes :

- **Les voies de signalisation de type I κ B/NF- κ B sont elles conservées entre l'anophèle et la drosophile ?**
- **La fonction de ces voies de signalisation dans la réponse aux infections bactériennes et fongiques est elle conservée entre l'anophèle et la drosophile ?**
- **Ces voies de signalisation jouent-elles un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire contre le plasmodium ?**

Chez la drosophile, il existe deux voies de type NF- κ B, la voie Toll, impliquée dans la réponse immunitaire contre les champignons et les bactéries à Gram positif et la voie Imd, impliquée dans la réponse immunitaire contre les bactéries à Gram négatif. Nous avons étudié les homologues des composants de la voie Toll en comparant les génomes de l'anophèle et de la drosophile. Nous avons pu montrer que la partie intracellulaire de la voie est assez bien conservée, avec la présence de deux orthologues, l'adaptateur MyD88 et le facteur de type I κ B, Cactus. Certaines familles de gènes, en particulier les composants extracellulaires de la voie (PGRP (PeptidoGlycan Recognition Protein), GNBP (Gram Negative Bacteria-binding Protein), peptides antimicrobiens) ont subi des amplifications ou des réductions. Le récepteur Toll n'a pas d'orthologue évident, mais une dizaine d'homologues. Pour la régulation transcriptionnelle des voies de type NF- κ B chez l'anophèle, on trouve un facteur de type I κ B, Cactus et deux facteurs de type NF- κ B, Rel1, apparenté à Dif impliqué dans la voie Toll et Rel2 apparenté à Relish qui est le facteur de transcription de la voie Imd. A l'issue de ce travail, nous pouvons dire que les voies NF- κ B de la drosophile, Toll et imd sont assez bien conservées au niveau intracellulaire chez l'anophèle.

Ces résultats, obtenus en grande partie grâce aux données issues de la publication du génome de l'anophèle nous ont permis de mener une étude comparative fonctionnelle de la voie de signalisation Toll chez la drosophile et chez l'anophèle. Nous avons tout d'abord commencé notre étude dans l'organisme drosophile, en réalisant des expériences de sauvetage de MyD88 de la drosophile par son orthologue chez l'anophèle. Ces expériences ont permis de montrer que la protéine d'anophèle peut activer la transcription du peptide antimicrobien drosomycine de la drosophile et qu'elle peut aussi remplacer

DmMyD88 dans son rôle développemental. Elles ont aussi mis en évidence des différences de fonctionnement des deux protéines, probablement dues à des domaines protéiques de MyD88 de fonction inconnue aujourd'hui (en particulier l'extension C-terminale spécifique des insectes). Nous avons ensuite réalisé des études fonctionnelles chez l'anophèle en utilisant la technique d'ARN interférence. Nous avons pu démontrer que l'anophèle utilise l'adaptateur MyD88 et le facteur de transcription Rel1 pour répondre aux infections par les champignons. D'autres groupes se sont plus particulièrement intéressés à la régulation des infections par les bactéries et ont démontré que le facteur de transcription Rel2 régule la réponse aux infections par les bactéries. Des évidences fonctionnelles existent donc aujourd'hui pour supporter l'existence de deux voies de signalisation de type NF- κ B, la voie « Rel1 », apparentée à la voie Toll, mais qui ne répondrait qu'aux infections fongiques, et la voie « Rel2 », apparentée à la voie Imd, impliquée dans l'immunité contre les bactéries. Les données sur ces deux voies sont parcellaires, mais comprennent suffisamment d'évidences fonctionnelles pour bâtir un modèle de la régulation du système de défense des anophèles contre les bactéries et les champignons.

L'anophèle est aujourd'hui un nouveau modèle d'étude du système immunitaire des insectes grâce aux technologies mises au point précédemment (ARN interférence, séquençage du génome) et à celles auxquelles nous avons contribué (banque d'ADNc). L'existence d'un deuxième modèle diptère va permettre comme nous avons pu le faire avec la protéine MyD88 de comparer les fonctions des éléments des cascades de signalisation. La comparaison réalisée entre MyD88 de drosophile et d'anophèle a permis de démontrer l'importance de domaines protéiques aux fonctions encore inconnues. La poursuite de ces expériences avec la réalisation de protéines chimères permettra sans doute de mieux comprendre les mécanismes de signalisation de la voie Toll. En effet, nous avons démontré dans le chapitre I que la signalisation par la voie Toll est différente selon qu'elle est utilisée au cours du développement ou lors de la réponse immunitaire. La comparaison de deux systèmes proches comme celui de l'anophèle et de la drosophile constitue un outil efficace pour poser et résoudre ces questions.

L'étude de la réponse immunitaire engagée par les anophèles suite aux infections bactériennes et fongiques a largement profité des connaissances acquises chez la drosophile. Le travail réalisé ici a permis de montrer que l'infection fongique est un « read-out » utilisable pour identifier de nouveaux composants de la voie Rel1, et les travaux doivent être poursuivis pour confirmer que *TEP1* et *LRIM1* peuvent être utilisés comme rapporteurs de la voie. Ainsi à l'aide de ces outils, il sera maintenant possible d'identifier le récepteur de la voie Rel1 et les protéines impliquées dans la reconnaissance des champignons, par une approche par gène candidat. L'analyse du génome de l'anophèle a permis d'extraire un certain nombre de candidats intéressants : 10 Toll, 6 cytokines de type Spaetzle, 7 PGRP et 6 GGBP. L'invalidation de ces candidats par ARN interférence et la réalisation de tests de survie puis de PCR quantitative en temps réel permettra de déterminer lesquels sont impliqués dans la voie Rel1. Une approche similaire pourrait être utilisée pour la voie

Rel2, pour laquelle il a été montré au cours de ce travail et dans d'autres équipes que les peptides antimicrobiens sont de bons rapporteurs. Ces travaux permettront de disposer de données fonctionnelles sur un grand nombre de protéines impliquées dans la reconnaissance et la signalisation suite aux infections bactériennes et fongiques chez l'anophèle. La facilité des analyses par ARN interférence chez l'anophèle et une meilleure connaissance des voies Rel1 et Rel2 permettront certainement à l'avenir de tester rapidement chez l'anophèle de nouveaux gènes candidats identifiés dans d'autres organismes (drosophile, vertébrés...).

Les deux premières questions posées au début de cette thèse trouvent ici une réponse :

- **Deux voies de type I κ B/NF- κ B sont retrouvées chez l'anophèle, La voie « Rel1 » apparentée à la voie Toll de la drosophile et la voie « Rel2 » proche de la voie Imd.**
- **Ces deux voies ont un rôle dans la réponse contre les infections fongiques et bactériennes, la voie « Rel1 » est impliquée dans la réponse aux infections fongiques et la voie « Rel2 » est impliquée dans la réponse aux infections bactériennes**

La question suivante que nous avons posée était celle de l'implication des voies de type I κ B/NF- κ B, donc Rel1 et Rel2 dans la réponse immunitaire contre le plasmodium. Nous avons démontré que la réponse immunitaire contre le plasmodium est composée de deux volets :

- Une réponse que nous avons appelée immunité basale, qui repose sur la circulation dans l'hémolymphe d'un certain nombre de molécules aux propriétés antiparasitaires. Cette immunité basale est sous le contrôle des voies Rel1 et Rel2. En manipulant les cascades NF- κ B de l'anophèle, nous avons pu moduler cette immunité basale. Nous avons montré que l'inactivation de *Rel1* et de *Rel2* diminue l'immunité basale et sensibilise les anophèles à l'infection par le plasmodium, alors que l'inactivation de *Cactus* augmente l'immunité basale et protège les anophèles contre l'infection par le plasmodium.

- Une réponse induite, intervenant 24 h après l'infection et se traduisant par le pic d'induction de *TEP1* et *LRIM1*. Ce deuxième volet est connu et étudié depuis une dizaine d'années. Nous avons montré que ni Rel1 ni Rel2 ne sont requis pour l'induction de *TEP1*, mais que Rel2 contrôle l'induction de *LRIM1*. Nous proposons donc qu'un facteur de transcription supplémentaire que nous avons appelé X joue un rôle important dans cette réponse.

Nous proposons à l'issue de ce travail que le rôle de l'immunité basale dans la réponse contre le plasmodium est fondamental. Ce système évoque les mécanismes de type complément des vertébrés. L'activation transcriptionnelle intervenant 24h après l'infection nous semble être la conséquence d'une perte importante de protéines de l'hémolymphe impliquées dans la reconnaissance et l'élimination des ookinètes dans les heures précédant. Nous avons pu démontrer qu'un facteur de transcription X est responsable de

la restauration du stock de transcrits de *TEP1* 24h après l'infection. Faute de pouvoir supprimer spécifiquement l'activation transcriptionnelle intervenant 24 h après l'infection, nous n'avons pas apporté la démonstration formelle de l'étendue de la contribution de l'immunité basale pour la réponse contre *P. berghei*. Il est d'ailleurs probable que l'induction de gènes intervenant 24h après l'infection permette de contrer la progression des ookinètes pénétrant l'intestin dans les fenêtres de temps plus tardives. Les ookinètes affluent dans l'intestin à partir de 18 h après l'infection et sans doute jusqu'à 40 h et mûrissent en oocystes en 6h environ. La fenêtre de temps sur laquelle l'immunité basale est active serait donc 18-24 h. Nous proposons que cette fenêtre soit en grande partie responsable de la propagation de l'infection dans les anophèles. Afin de démontrer complètement cette hypothèse, il faudrait identifier le facteur de transcription X. Identifier ce facteur pourrait peut-être permettre qui plus est d'apporter une contribution à la question de savoir combien exactement d'ookinètes sont détruits par le système immunitaire de l'anophèle. Dans des conditions comparables (une infection avec entre 50 et 100 oocystes en moyenne dans les intestins contrôle), l'invalidation de *TEP1* donne de 3 à 4 fois plus d'oocystes, l'invalidation conjointe de *Rel1* et *Rel2* en donne 2,5 fois plus, l'invalidation de *LRIM1* en donne environ 3 fois plus. Si la phase d'induction à 24 h est un déterminant important de l'immunité contre *P. berghei*, alors l'invalidation de *Rel1*, *Rel2* et X devrait donner un nombre très important d'oocystes dans les intestins, voire supérieur à ce qui a été observé jusque là. Pour trouver ce facteur de transcription X, nous avons réalisé une analyse des promoteurs de *TEP1* et de *LRIM1*. Les deux promoteurs contiennent des sites de type IRF (Interferon Regulatory Factor, qui peut être une cible directe de certains TLR chez les mammifères), GATA, STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)... qui sont autant de candidats intéressants pour ces fonctions. Il serait important de réaliser une comparaison automatisée de ces deux promoteurs (celui de *TEP1* qui est régulé par le facteur X et celui de *LRIM1* qui n'est pas régulé par ce facteur), afin de réaliser une analyse comparative non biaisée et tenant compte d'autres paramètres tels que la distance des sites à l'ATG, leur degré de ressemblance aux sites canoniques... Par ailleurs, une analyse par BLAST ou par recherche de domaines chez l'anophèle pourrait permettre de détecter l'existence de tel ou tel facteur de transcription.

Les résultats présentés dans cette partie répondent à la troisième question que nous avons posée. Nous avons démontré que les voies de type NF- κ B ont un rôle dans le maintien d'une immunité basale, nécessaire pour limiter l'infection par *P. berghei*. Par ailleurs, nous avons aussi démontré que l'invalidation du gène codant pour le facteur de type I κ B Cactus bloque la transmission de *P. berghei* en augmentant le niveau de cette immunité basale.

Nous nous sommes ensuite attaché au cours de ce travail à comprendre mieux le phénotype entraîné par l'invalidation de *Cactus*. Nous avons démontré que l'élimination des ookinètes suite à l'invalidation de *Cactus* dépend de Rel1. Ainsi, nous avons réussi à rendre les anophèles réfractaires à *P. berghei* par la simple manipulation de la cassette de type I κ B/NF- κ B *Cactus*/Rel1. L'invalidation de *Cactus* peut alors être utilisée comme un outil puissant pour comprendre les mécanismes de défense des anophèles contre *P. berghei*. Ces travaux nous permettront de passer de la connaissance des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire contre *P. berghei* à la découverte de nouveaux effecteurs de cette réponse immunitaire. Nous avons démontré que TEP1 contribue très partiellement à l'élimination des ookinètes médiée par la cassette *Cactus*/Rel1, ce qui signifie que d'autres protéines contrôlées par cette cassette ont des effets antiparasitaires. Un candidat trivial qui n'a pas encore été testé est LRIM1. Pour trouver de nouveaux candidats, nous avons initié une approche génomique par puces à ADN afin de connaître les cibles de la cassette *Cactus*/Rel1 responsables de l'élimination complète des ookinètes suite à l'invalidation de *Cactus*. Ces puces à ADN ont permis de constituer des listes de gènes, régulés par la cassette *Cactus*/Rel1, mais aussi par Rel2. Elles ont montré que le profil transcriptionnel de la cassette *Cactus*/Rel1 est très spécifique, avec notamment un grand nombre de sérines protéases. L'analyse fonctionnelle des candidats issus de cette expérience est en cours, et n'a pas permis pour l'instant d'identifier de gène capable de restaurer la survie des oocystes en contexte d'invalidation de *Cactus*. Afin de trouver de nouveaux candidats, il serait intéressant de réaliser une nouvelle série de puces à ADN sur des moustiques invalidés pour *Rel1* et *Rel2*. Celle-ci permettrait une comparaison directe entre des anophèles dont l'immunité basale a été artificiellement augmentée ou réduite, et l'on sait grâce aux travaux présentés ici que ces différences sont directement responsables de la plus ou moins bonne survie de *P. berghei* chez l'anophèle. Les expériences de double invalidation de *Cactus* et des candidats issus de ces analyses permettront de tester le rôle éventuel de nouveaux gènes dans la réponse immunitaire contre *P. berghei*.

Les travaux réalisés sur le modèle *P. berghei* nous ont permis de montrer l'importance de l'immunité basale dans la défense contre cette invasion et les outils qui pourront être mis en place grâce aux travaux présentés ici permettront de poser d'une manière nouvelle la question de la recherche de nouveaux effecteurs et de nouvelles voies de signalisation impliqués dans la réponse immunitaire d'*A. gambiae* contre *P. berghei*. Nous avons élargi ces travaux à l'étude de l'effet de l'invalidation de *Cactus* sur le développement du parasite responsable du paludisme *P. falciparum*. Les premiers résultats sont encourageants et montrent que l'invalidation de *Cactus* peut diminuer notablement la prévalence en oocystes et le niveau de l'infection de *P. falciparum* chez *A. gambiae*. Ce résultat reste à confirmer, mais permettent de rappeler que les deux parasites sont différents, *P. falciparum* a coévolué avec

A. gambiae ce qui n'est pas le cas de *P. berghei*. Quels sont les mécanismes mis au point par *A. gambiae* pour limiter l'invasion par *P. falciparum* et quelles sont les réponses mises en place par *P. falciparum* pour assurer sa dispersion malgré tout ? Ces questions extrêmement intéressantes pourront être mieux comprises lorsque davantage de données seront acquises sur les deux modèles de plasmodium. Les expériences réalisées ici sont à poursuivre dans cet esprit, car la comparaison des deux modèles est un outil de choix pour comprendre les interactions entre anophèle et plasmodium. Nous pourrions envisager de réaliser des expériences d'immunohistochimie 18, 24 et 48 h après l'infection par *P. falciparum*, afin de suivre le développement des ookinètes. Actuellement ces travaux sont limités par le faible nombre d'effecteurs connus de la réponse immunitaire contre plasmodium, mais les données qui seront acquises chez *P. berghei* grâce à la recherche des cibles de Cactus/Rel1 permettront probablement d'en identifier de nouveaux. Par la suite, la fabrication d'anticorps dirigés contre ces effecteurs et la comparaison de leur localisation chez *P. berghei* et *P. falciparum* constituera un outil pour identifier les différences entre les réponses à ces deux parasites et comprendre ainsi les mécanismes d'évasion éventuellement mis en place par *P. falciparum*. Par ailleurs, pour évaluer la contribution de l'immunité basale à la réponse contre *P. falciparum*, il serait intéressant d'invalider *Rel1* et *Rel2* chez l'anophèle pour voir si cela facilite le développement des oocystes de *P. falciparum*.

Les résultats décrits ici permettent d'envisager la possibilité de l'amélioration des défenses immunitaires de l'anophèle contre *P. falciparum* afin de limiter la prévalence des infections. Pour envisager d'utiliser l'invalidation de *Cactus* comme un outil contre le paludisme, beaucoup de travail reste à faire. Cependant il serait extrêmement intéressant de commencer les recherches dans cette voie un peu plus appliquée. L'idée serait être de trouver par criblage une substance capable de mimer les effets de Cactus et qui serait facile à administrer aux moustiques. Ce pan de recherches à finalité plus appliquée pourrait constituer une première tentative d'utiliser les connaissances acquises sur l'immunité de l'anophèle pour modifier sa réponse au plasmodium.

Bibliographie

- Anderson, K. V., and Nusslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* *311*, 223-227.
- Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J. A., and Kafatos, F. C. (1996). Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Embo J* *15*, 4691-4701.
- Bartholomay, L. C., Farid, H. A., Ramzy, R. M., and Christensen, B. M. (2003). *Culex pipiens pipiens*: characterization of immune peptides and the influence of immune activation on development of *Wuchereria bancrofti*. *Mol Biochem Parasitol* *130*, 43-50.
- Bian, G., Shin, S. W., Cheon, H. M., Kokoza, V., and Raikhel, A. S. (2005). Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13568-13573.
- Blandin, S., Moita, L. F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C., and Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. In *EMBO Rep*, pp. 852-856.
- Blandin, S., Shiao, S. H., Moita, L. F., Janse, C. J., Waters, A. P., Kafatos, F. C., and Levashina, E. A. (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* *116*, 661-670.
- Blanford, S., Chan, B. H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R. J., Read, A. F., and Thomas, M. B. (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* *308*, 1638-1641.
- Boman, H. G. (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* *65*, 205-207.
- Boman, H. G., and Hultmark, D. (1987). Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol* *41*, 103-126.
- 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.
- Boudin, C., Diop, A., Gaye, A., Gadiaga, L., Gouagna, C., Safeukui, I., and Bonnet, S. (2005). Plasmodium Falciparum Transmission Blocking Immunity in Three Areas with Perennial or Seasonal Endemicity and Different Levels of Transmission. *Am J Trop Med Hyg* *73*, 1090-1095.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401-415.
- Brooker, S., Guyatt, H., Omumbo, J., Shretta, R., Drake, L., and Ouma, J. (2000). Situation analysis of malaria in school-aged children in Kenya - what can be done? *Parasitol Today* *16*, 183-186.
- Cao, Z., Henzel, W., and Gao, X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* *271*, 1128-1131.
- Cerenius, L., and Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* *198*, 116-126.
- Charatsi, I., Luschig, S., Bartoszewski, S., Nusslein-Volhard, C., and Moussian, B. (2003). Krapfen/dMyd88 is required for the establishment of dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* *120*, 219-226.

- Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., Collins, F. H., Danielli, A., Dimopoulos, G., *et al.* (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159-165.
- Collins, F. H., Sakai, R. K., Vernick, K. D., Paskewitz, S., Seeley, D. C., Miller, L. H., Collins, W. E., Campbell, C. C., and Gwadz, R. W. (1986). Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 234, 607-610.
- Cramer, P., Varrot, A., Barillas-Mury, C., Kafatos, F. C., and Muller, C. W. (1999). Structure of the specificity domain of the Dorsal homologue Gambif1 bound to DNA. *Structure* 7, 841-852.
- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Tzou, P., Rubin, G. M., and Lemaitre, B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *Embo J* 21, 2568-2579.
- Dimopoulos, G., Christophides, G. K., Meister, S., Schultz, J., White, K. P., Barillas-Mury, C., and Kafatos, F. C. (2002). Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8814-8819.
- Dimopoulos, G., Richman, A., della Torre, A., Kafatos, F. C., and Louis, C. (1996). Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13066-13071.
- 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.
- Edwards, D. N., Towb, P., and Wasserman, S. A. (1997). An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development* 124, 3855-3864.
- 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.
- Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R. E., Waters, A. P., and Janse, C. J. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 137, 23-33.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. A., and Imler, J. L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *drosophila*. *Nat Immunol*.
- Galindo, R. L., Edwards, D. N., Gillespie, S. K., and Wasserman, S. A. (1995). Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development* 121, 2209-2218.
- Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., Carlton, J. M., Kooij, T. W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C. S., Pain, A., Christophides, G. K., *et al.* (2005). A comprehensive survey of

- the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* 307, 82-86.
- Hoffmann, J. A. (1995). Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 7, 4-10.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3, 121-126.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M., Wides, R., *et al.* (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149.
- Hornig, T., and Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12654-12658.
- Hultmark, D. (1993). Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet* 9, 178-183.
- Hurd, H. (2001). Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trends Parasitol* 17, 363-368.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., and Hetru, C. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15119-15124.
- Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., and Beyaert, R. (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 12, 467-471.
- Kambris, Z., Bilak, H., D'Alessandro, R., Belvin, M., Imler, J. L., and Capovilla, M. (2003). DmMyD88 controls dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *EMBO Rep* 4, 64-69.
- 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.
- Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila* cactus locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell* 71, 623-635.
- Lacroix, R., Mukabana, W. R., Gouagna, L. C., and Koella, J. C. (2005). Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol* 3, e298.
- Leclerc, V., Pelte, N., El Chamy, L., Martinelli, C., Ligoxygakis, P., Hoffmann, J. A., and Reichhart, J. M. (2006). Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep* 7, 231-235.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9465-9469.

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14614-14619.
- 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.
- Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B., and Imler, J. L. (1998). Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide *metchnikowin*. *J Mol Biol* 278, 515-527.
- Manfruelli, P., Reichhart, J. M., Steward, R., Hoffmann, J. A., and Lemaitre, B. (1999). A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. *Embo J* 18, 3380-3391.
- Marchler-Bauer, A., and Bryant, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32, W327-331.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [see comments]. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.
- Meister, M., and Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 5, 573-580.
- Meister, S., Kanzok, S. M., Zheng, X. L., Luna, C., Li, T. R., Hoa, N. T., Clayton, J. R., White, K. P., Kafatos, F. C., Christophides, G. K., and Zheng, L. (2005). Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11420-11425.
- Moita, L. F., Wang-Sattler, R., Michel, K., Zimmermann, T., Blandin, S., Levashina, E. A., and Kafatos, F. C. (2005). In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity* 23, 65-73.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., and Peng, Z. Y. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13, 1435-1448.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J., *Biodiversité du paludisme dans le monde*, Paris : Editions John Libbey Eurotext, 428p
- Moussian, B., and Roth, S. (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol* 15, R887-899.
- Nüsslein-Volhard, C. (1979). Maternal effect mutations that alter the spatial coordinates of the embryo. *Academic Press* , 0, 185-211.
- O'Neill, L. A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18, 3-9.

- Osta, M. A., Christophides, G. K., and Kafatos, F. C. (2004). Effects of mosquito genes on Plasmodium development. *Science* 303, 2030-2032.
- Richman, A. M., Bulet, P., Hetru, C., Barillas-Mury, C., Hoffmann, J. A., and Kafatos, F. C. (1996). Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Mol Biol* 5, 203-210.
- Richman, A. M., Dimopoulos, G., Seeley, D., and Kafatos, F. C. (1997). Plasmodium activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Embo J* 16, 6114-6119.
- Rodhain F. et Perez C., *Précis d'entomologie vétérinaire et médicale*, Paris : Editions Maloine, 458p,1985.
- Roth, S., Hiromi, Y., Godt, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). cactus, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos. *Development* 112, 371-388.
- Royet, J., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (2005). Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr Opin Immunol* 17, 11-17.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A., and Ferrandon, D. (2000). Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat Immunol* 1, 342-347.
- Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* 168, 1542-1546.
- Sachs, J., and Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature* 415, 680-685.
- Salazar, C. E., Mills-Hamm, D., Kumar, V., and Collins, F. H. (1993). Sequence of a cDNA from the mosquito *Anopheles gambiae* encoding a homologue of human ribosomal protein S7. *Nucleic Acids Res* 21, 4147.
- Schneider, D., and Shahabuddin, M. (2000). Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science* 288, 2376-2379.
- Scholte, E. J., Knols, B. G., Samson, R. A., and Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J Insect Sci* 4, 19.
- Scholte, E. J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaajmans, K., Abdulla, S., Killeen, G. F., and Knols, B. G. (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* 308, 1641-1642.
- Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1989). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations. *Genetics* 121, 101-117.
- Shin, S. W., Kokoza, V., Ahmed, A., and Raikhel, A. S. (2002). Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF-kappa B transcription factor Relish from the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9978-9983.

- Shin, S. W., Kokoza, V., Bian, G., Cheon, H. M., Kim, Y. J., and Raikhel, A. S. (2005). REL1, a homologue of *Drosophila dorsal*, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* *280*, 16499-16507.
- Shin, S. W., Kokoza, V., Lobkov, I., and Raikhel, A. S. (2003). Relish-mediated immune deficiency in the transgenic mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2616-2621.
- Sinden, R. E. (1999). *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia* *41*, 139-148.
- Sinden, R. E. (2002). Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol* *4*, 713-724.
- Sinden, R. E., and Billingsley, P. F. (2001). *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol* *17*, 209-212.
- Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G., and Wasserman, S. A. (2002). A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12871-12876.
- Sun, H., Towb, P., Chiem, D. N., Foster, B. A., and Wasserman, S. A. (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *Embo J* *23*, 100-110.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W., and Taniguchi, T. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* *434*, 243-249.
- Tatei, K., and Levine, M. (1995). Specificity of Rel-inhibitor interactions in *Drosophila* embryos. *Mol Cell Biol* *15*, 3627-3634.
- 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.
- Tchuinkam, T., Mulder, B., Dechering, K., Stoffels, H., Verhave, J. P., Cot, M., Carnevale, P., Meuwissen, J. H., and Robert, V. (1993). Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop Med Parasitol* *44*, 271-276.
- Vincke IH, Lips M. Un nouveau *Plasmodium* d'un rongeur sauvage du Congo, *Plasmodium berghei* n.sp. *Ann Soc Belg Med Trop* 1948 ; 28 :97-104
- Vizioli, J., Bulet, P., Charlet, M., Lowenberger, C., Blass, C., Müller, H. M., Dimopoulos, G., Hoffmann, J., Kafatos, F. C., and Richman, A. (2000). Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* *9*, 75-84.
- Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Müller, H. M., and Dimopoulos, G. (2001a). Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12630-12635.
- Vizioli, J., Richman, A. M., Uttenweiler-Joseph, S., Blass, C., and Bulet, P. (2001b). The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* *31*, 241-248.

Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., and Ding, W. (2006a). RNA Interference Directs Innate Immunity Against Viruses in Adult *Drosophila*. *Science*.

Wang, X. W., Tan, N. S., Ho, B., and Ding, J. L. (2006b). Evidence for the ancient origin of the NF-kappaB/IkappaB cascade: its archaic role in pathogen infection and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4204-4209.

Whitten, M. M., Shiao, S. H., and Levashina, E. A. (2006). Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite Immunol* *28*, 121-130.

Zdobnov, E. M., von Mering, C., Letunic, I., Torrents, D., Suyama, M., Copley, R. R., Christophides, G. K., Thomasova, D., Holt, R. A., Subramanian, G. M., *et al.* (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* *298*, 149-159.

Zheng, L., Cornel, A. J., Wang, R., Erfle, H., Voss, H., Ansorge, W., Kafatos, F. C., and Collins, F. H. (1997). Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* *276*, 425-428.

Zheng, X. L., and Zheng, A. L. (2002). Genomic organization and regulation of three cecropin genes in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* *11*, 517-525.

Annexe

	Induction C vs CG	Nom usuel	numéro ENSANGT
123	1.546	CG31150	ENSANGT0000001201
124	1.544	SAK	ENSANGT00000012765
125	1.541	gb:BM601222	
126	1.541	gb:BX620504	
127	1.54	ENSANGT00000010163	ENSANGT00000010163
128	1.535	ENSANGT00000010252	ENSANGT00000010252
129	1.534	ENSANGT00000026717	ENSANGT00000026717
130	1.528	gb:BM631635	
131	1.528	FBN12	ENSANGT00000020573
132	1.521	ENSANGT00000028849	ENSANGT00000028849
133	1.518	pros	ENSANGT00000010936
134	1.508	ENSANGT00000015844	ENSANGT00000015844
135	1.505	TEP9	ENSANGT00000018121

	Induction C vs CR1	Nom usuel	numéro ENSANGT
61	1.824	CG40160	ENSANGT0000020006
62	1.823	ENSANGT00000022222	ENSANGT00000022222
63	1.821	ENSANGT00000012586	ENSANGT00000012586
64	1.82	CG16705	ENSANGT0000000070
65	1.817	CdsA	ENSANGT0000018867
66	1.812	ENSANGT00000024108	ENSANGT00000024108
67	1.804	CLIPB8	ENSANGT0000002596
68	1.801	b	ENSANGT0000013909
69	1.792	CG13384	ENSANGT0000019274
70	1.789	gb:AJ283673	
71	1.78	CaJpa	ENSANGT0000016813
72	1.777	CLIPB7	ENSANGT0000021656
73	1.761	Rsq-3	ENSANGT0000016011
74	1.742	gb:BM577172	ENSANGT0000010638
75	1.738	toiP	ENSANGT0000028469
76	1.733	gb:BM593593	
77	1.732	gb:BX06099.	
78	1.731	CLIPA7	ENSANGT0000020175
79	1.707	gb:BM603890	
80	1.702	TEP3	ENSANGT0000016283
81	1.694	ENSANGT00000025670	ENSANGT00000025670
82	1.692	ENSANGT0000016561	ENSANGT0000016561
83	1.69	CG12086	ENSANGT0000014515
84	1.68	CLIPB2	ENSANGT0000020252
85	1.676	rdgB	ENSANGT0000004742
86	1.675	gb:BX606405	ENSANGT0000016786
87	1.671	ENSANGT0000016737	ENSANGT0000016737
88	1.669	ik2	ENSANGT0000020964
89	1.663	CLIPB3	ENSANGT0000013572
90	1.662	CG3403	ENSANGT0000024127
91	1.66	CG14181	ENSANGT0000013529
92	1.659	Gp93	ENSANGT0000015826
93	1.654	ENSANGT0000027650	ENSANGT0000027650
94	1.653	BcDNA:LD23634	ENSANGT0000011728
95	1.652	gb:AJ283570	
96	1.651	CG17081	ENSANGT0000012638
97	1.648	ENSANGT0000021513	ENSANGT0000021513
98	1.645	gb:AJ280089	
99	1.644	EG:BACR7A4.5	ENSANGT0000016081
100	1.629	ENSANGT00000014723	ENSANGT00000014723
101	1.621	brat	ENSANGT0000006075
102	1.611	ENSANGT00000018284	ENSANGT00000018284
103	1.599	ENSANGT00000012321	ENSANGT00000012321
104	1.595	biot	ENSANGT0000022208
105	1.592	gb:BM592090	ENSANGT0000003468
106	1.588	gb:AJ283421	
107	1.587	CG4164	ENSANGT0000018254
108	1.583	CG10344	ENSANGT0000016708
109	1.581	yellow-f2	ENSANGT0000029284
110	1.579	38232	ENSANGT0000015913
111	1.579	Pka-C3	ENSANGT0000020143
112	1.572	ENSANGT00000010825	ENSANGT00000010825
113	1.571	Gambif	ENSANGT0000011101
114	1.571	gb:BM641171	
115	1.564	gb:BM580305	ENSANGT0000020924
116	1.563	Rgl	ENSANGT0000028618
117	1.562	ENSANGT00000028419	ENSANGT00000028419
118	1.561	CG7332	ENSANGT0000020039
119	1.558	ENSANGT00000015602	ENSANGT00000015602
120	1.554	gb:BM610040	

	Induction C vs CR1	Nom usuel	numéro ENSANGT
1	8.416	CG15725	ENSANGT0000017754
2	3.525	yellow-f2	ENSANGT0000013424
3	3.512	ENSANGT0000026825	ENSANGT0000026825
4	3.148	CG32046	ENSANGT0000029091
5	3.131	CG7814	ENSANGT0000019871
6	3.127	CG17032	ENSANGT0000009630
7	3.077	AF46549.1.1	AF46549.1.1
8	3.005	CG31847	ENSANGT0000023476
9	2.983	CG31832	ENSANGT0000022610
10	2.913	chico	ENSANGT0000026859
11	2.907	Fmo-1	ENSANGT0000010229
12	2.868	CLIPB9	ENSANGT0000020324
13	2.713	Gld	ENSANGT0000012169
14	2.662	CG4476	ENSANGT0000026669
15	2.628	gth	ENSANGT0000026798
16	2.62	CG4927	ENSANGT0000026824
17	2.609	ENSANGT0000029304	ENSANGT0000029304
18	2.51	sis	ENSANGT0000028872
19	2.499	gb:BM657724	
20	2.486	gb:AJ281635	
21	2.434	gb:AJ284101	
22	2.342	gb:BM618053	ENSANGT0000012237
23	2.269	CG6330	ENSANGT0000022369
24	2.253	CG10101	ENSANGT0000018401
25	2.247	gb:BM639184	
26	2.219	ENSANGT0000029138	ENSANGT0000029138
27	2.207	gb:BX013881.	ENSANGT0000025438
28	2.14	CG12918	ENSANGT0000013093
29	2.125	CG68360	ENSANGT0000010458
30	2.101	DI2	ENSANGT0000027391
31	2.099	I(2)04154	ENSANGT0000026262
32	2.089	ENSANGT0000013548	ENSANGT0000013548
33	2.059	Cyp305a1	ENSANGT0000025694
34	2.059	Cyp305a1	ENSANGT0000025694
35	2.02	gb:BX034204.	
36	2.005	CG18397	ENSANGT0000026711
37	1.986	CLIPB2	ENSANGT0000023836
38	1.977	gb:BX626106	
39	1.965	CG12155	ENSANGT0000028297
40	1.963	ENSANGT0000027014	ENSANGT0000027014
41	1.961	CG14516	ENSANGT0000023194
42	1.953	ENSANGT0000021354	ENSANGT0000021354
43	1.946	gb:AJ280137	
44	1.944	gb:AJ284005	
45	1.942	gb:BX09088.	ENSANGT0000013219
46	1.935	CG14303	ENSANGT0000029363
47	1.933	ENSANGT0000021822	ENSANGT0000021822
48	1.918	gb:BM610336	
49	1.907	Pf.1.109.0. CDS	Pf.1.109.0. CDS
50	1.898	CG1756	ENSANGT0000021390
51	1.887	CG15097	ENSANGT0000022195
52	1.878	Hsc70-3	ENSANGT0000012893
53	1.876	gb:AL933242	
54	1.873	timeout	ENSANGT0000021209
55	1.872	gb:BM593423	
56	1.862	ENSANGT0000016194	ENSANGT0000016194
57	1.852	Pf.5.268.0. CDS	Pf.5.268.0. CDS
58	1.845	ENSANGT0000021694	ENSANGT0000021694
59	1.83	gb:BM623417	
60	1.827	CG11529	ENSANGT0000021092

Tableau A.1. Les gènes cibles de la cassette Cactus/Rel1

Induction C vs. CR1	Nom usuel	numéro ENSANGT
61	1.638 gb:BM576665	ENSANGT0000003584
62	1.635 fu2	ENSANGT0000000312
63	1.624 ENSANGT0000000312	ENSANGT0000012094
64	1.623 Snr1	ENSANGT0000012925
65	1.617 CG15628	
66	1.611 gb:BM590897	
67	1.608 gb:AL930133	
68	1.607 gb:BM646033	ENSANGT0000006261
69	1.606 pnr	ENSANGT00000013942
70	1.598 Paps	
71	1.598 gb:BM654419	ENSANGT00000022461
72	1.588 Hn	ENSANGT000002158
73	1.586 CG9307	ENSANGT0000014813
74	1.582 CG5618	ENSANGT0000015293
75	1.575 gb:BX029972.	ENSANGT0000009742
76	1.564 CG8207	ENSANGT0000009742
77	1.562 CG9062	ENSANGT0000001491
78	1.562 CG10581	
79	1.561 gb:A1280790	
80	1.558 gb:BM579733	ENSANGT00000013629
81	1.553 ENSANGT00000013629	ENSANGT0000028674
82	1.548 Indy	ENSANGT0000012255
83	1.548 CG16947	
84	1.546 gb:BM586053	ENSANGT0000017749
85	1.546 CG3342	ENSANGT0000015764
86	1.546 gb:BX062570.	ENSANGT0000007659
87	1.54 CG12090	ENSANGT000002042
88	1.536 EG:8D8.4	ENSANGT00000020166
89	1.535 CLIPA6	
90	1.533 gb:BM634500	ENSANGT00000020000
91	1.533 CG5326	
92	1.528 ENSANGT00000025119	ENSANGT00000025119
93	1.527 CG3409	ENSANGT0000020909
94	1.525 Pk17E	ENSANGT0000012383
95	1.522 CG2508	ENSANGT00000014868
96	1.519 gb:A1283686	
97	1.517 ENSANGT00000029038	ENSANGT00000029038
98	1.517 gb:A1284558	
99	1.517 CG14444	ENSANGT0000017170
100	1.516 gb:BX040521.	
101	1.515 CG7915	ENSANGT0000013511
102	1.514 CG7075	ENSANGT0000006595
103	1.512 gb:BM648782	
104	1.512 debcl	ENSANGT0000015394
105	1.511 gb:BM653554	
106	1.508 SRPN5	ENSANGT00000010507
107	1.507 gb:BM649773	
108	1.504 U50475.1	ENSANGT0000004408
109	1.504 ENSANGT00000013508	ENSANGT0000013508
110	1.502 CLIPB17	ENSANGT00000022148
111	1.501 ENSANGT00000011868	ENSANGT00000011868

Tableau A.2. Les gènes cibles de la cassette Cactus/Rel1 dépendant aussi de Rel2

Induction C vs. CR1	Nom usuel	numéro ENSANGT
1	4.013 Or19b	ENSANGT0000028755
2	3.064 Lys5	ENSANGT0000017890
3	2.923 ENSANGT0000016562	ENSANGT0000016562
4	2.859 Cyp9f2	ENSANGT0000024595
5	2.7 REL2	ENSANGT0000020234
6	2.636 dally	ENSANGT0000010385
7	2.351 gb:A1280306	
8	2.288 CG6606	ENSANGT00000019884
9	2.123 gb:BM625417	
10	2.094 CG12926	ENSANGT0000013947
11	2.064 CG12870	ENSANGT0000019511
12	2.055 CG8232	ENSANGT0000027601
13	2.019 ENSANGT0000024158	ENSANGT0000024158
14	1.96 CG15309	ENSANGT0000019801
15	1.933 CG40160	ENSANGT0000008842
16	1.931 nAcRaipha-34E	ENSANGT0000022977
17	1.921 ENSANGT0000017337	ENSANGT00000017337
18	1.914 Myo10A	ENSANGT0000003748
19	1.913 EG:BACR37P7.8	ENSANGT0000008225
20	1.902 ENSANGT0000029388	ENSANGT0000029388
21	1.901 gb:BM612289	
22	1.883 gb:A1280543	
23	1.88 ENSANGT0000021063	ENSANGT0000021063
24	1.87 gb:A1280263	ENSANGT0000011440
25	1.87 wb	ENSANGT0000029436
26	1.858 ENSANGT0000022327	ENSANGT0000022327
27	1.857 gb:BM632140	
28	1.806 ENSANGT0000025894	ENSANGT0000025894
29	1.799 A120404.1_RC	A120404.1_RC
30	1.786 gb:AL930385	
31	1.782 gb:A1284004	
32	1.774 gb:BM610329	
33	1.759 gb:A1282206	
34	1.758 stumps	ENSANGT0000018141
35	1.75 BcDNA:GH09147	ENSANGT0000021852
36	1.737 CG31812	ENSANGT0000010953
37	1.703 gb:A1280261	
38	1.7 gb:BM652397	
39	1.7 gb:BM650676	
40	1.697 GNEPA2	ENSANGT0000008943
41	1.684 gb:BM649477	
42	1.683 CG10264	ENSANGT0000018335
43	1.681 CG32701	ENSANGT0000012186
44	1.681 KdeIR	ENSANGT0000029634
45	1.68 Ppn	ENSANGT0000022061
46	1.679 Cas	ENSANGT0000029287
47	1.679 CG16953	ENSANGT0000020146
48	1.678 tam	ENSANGT0000008130
49	1.671 ninA	ENSANGT0000020279
50	1.671 gb:BX628707	
51	1.663 tou	ENSANGT00000011787
52	1.66 Caf1-105	ENSANGT0000010753
53	1.659 ENSANGT00000011775	ENSANGT00000011775
54	1.657 gb:BM632357	
55	1.655 psq	ENSANGT00000028232
56	1.65 gb:BM636291	
57	1.645 gb:BM575492	
58	1.643 snRN70K	ENSANGT0000028016
59	1.64 gb:A1280240	
60	1.64 CG31531	ENSANGT00000011497

	Induction C vs CR2	Nom usuel	numéro ENSANGT
61	1.55	Pmm45A	ENSANGT0000018282
62	1.548	CG9232	ENSANGT0000017622
63	1.546	CG7356	ENSANGT0000015956
64	1.544	qb:BX045013.	
65	1.533	CG9357	ENSANGT0000020485
66	1.529	CG10026	ENSANGT0000023730
67	1.528	S9s3	ENSANGT0000016899
68	1.526	PPO2	ENSANGT0000020648
69	1.502	Mlo	ENSANGT0000026273

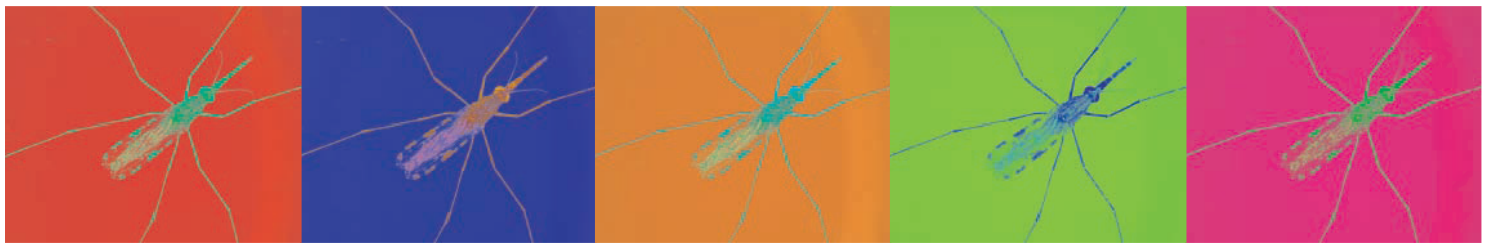
	Induction C vs CR2	Nom usuel	numéro ENSANGT
1	6.388	FBN9	ENSANGT0000011248
2	3.884	qb:BM610336	
3	3.699	PGRPLB	ENSANGT0000013948
4	3.302	qb:BX626139	
5	2.901	ENSANGT00000029631	ENSANGT00000029631
6	2.658	ENSANGT00000013295	ENSANGT00000013295
7	2.49	CG10657	ENSANGT0000017842
8	2.435	CEC1	ENSANGT0000011957
9	2.404	CG5618	ENSANGT0000015928
10	2.376	qb:BM583589	ENSANGT0000011957
11	2.34	CG13667	ENSANGT00000026058
12	2.278	PGRPS3	ENSANGT0000012979
13	2.26	CLIPC7	ENSANGT0000021259
14	2.208	Mih1	ENSANGT0000014016
15	2.152	CG4660	ENSANGT0000015975
16	2.082	ENSANGT00000029374	ENSANGT00000029374
17	2.064	qb:AJ285093	
18	2.061	ENSANGT00000012986	ENSANGT00000012986
19	2.06	beat-Va	ENSANGT00000025524
20	2.054	ENSANGT00000027194	ENSANGT00000027194
21	2.049	qb:AJ280892	
22	2.045	CG10168	ENSANGT00000015407
23	2.023	CTCF	ENSANGT00000027775
24	2.006	ENSANGT00000012150	ENSANGT00000012150
25	1.989	ENSANGT00000022041	ENSANGT00000022041
26	1.987	Y17702.1	ENSANGT00000023852
27	1.966	TEP4	ENSANGT00000021216
28	1.94	CG12896	ENSANGT00000020201
29	1.919	ENSANGT00000026126	ENSANGT00000026126
30	1.916	ENSANGT00000011772	ENSANGT00000011772
31	1.874	qb:AL934667	
32	1.87	CG9521	ENSANGT00000015865
33	1.855	FBN1	ENSANGT00000015012
34	1.843	qb:BM614141	
35	1.832	FBN24A/B	
36	1.804	rap	ENSANGT00000017686
37	1.799	CG6321	ENSANGT00000024221
38	1.795	Ptp52F	ENSANGT00000019140
39	1.788	CG5392	ENSANGT00000000511
40	1.775	Sgalpha	ENSANGT00000020731
41	1.774	CG11791	ENSANGT00000027795
42	1.773	CG31108	ENSANGT00000013369
43	1.736	GPRbos	ENSANGT00000013404
44	1.717	CG9215	ENSANGT00000027941
45	1.7	OBP22	ENSANGT00000023972
46	1.695	ENSANGT00000027194	ENSANGT00000027194
47	1.685	qb:BX467199	
48	1.683	CG9699	ENSANGT00000017451
49	1.668	Ntg	ENSANGT00000024255
50	1.665	CG9448	ENSANGT00000017864
51	1.641	CG31004	ENSANGT00000017306
52	1.637	ENSANGT0000002156	ENSANGT0000002156
53	1.628	Abi	ENSANGT0000002451
54	1.603	CG8665	ENSANGT00000021005
55	1.599	tgo	ENSANGT00000000269
56	1.598	bw	ENSANGT00000025873
57	1.597	qb:AJ280658	
58	1.581	FBN1	ENSANGT00000015012
59	1.575	OBP49	ENSANGT00000024247
60	1.574	DEF1	ENSANGT00000015621

Tableau A.3. Les gènes cibles de Rel2 et de la cassette Cactus/Rel2

Induction C vs. CR2	Nom usuel	numéro ENSANGT
61	1.561 CG30456	ENSANGT0000019802
62	1.556 gb:AJ285061	
63	1.556 gb:BM626450	
64	1.555 gb:BM639226	
65	1.555 chico	ENSANGT0000026859
66	1.544 ENSANGT0000015066	ENSANGT0000015066
67	1.537 CG12926	ENSANGT0000013947
68	1.534 gb:AJ280263	ENSANGT0000011440
69	1.534 ENSANGT0000026415	ENSANGT0000026415
70	1.526 CG11176	ENSANGT0000010867
71	1.526 ENSANGT0000007157	ENSANGT0000007157
72	1.526 ENSANGT0000028721	ENSANGT0000028721
73	1.519 ENSANGT0000015880	ENSANGT0000015880
74	1.514 CG4532	ENSANGT0000020541
75	1.514 gb:AJ283712	
76	1.513 CG10581	ENSANGT0000014191
77	1.513 gb:BM577717	
78	1.513 Paps	ENSANGT0000013942
79	1.512 ENSANGT0000013629	ENSANGT0000013629
80	1.511 Caf1-105	ENSANGT0000010753
81	1.508 CG5550	ENSANGT0000022867
82	1.504 gb:AJ280543	
83	1.503 gb:BM629135	
84	1.503 gb:BX620341	

Induction C vs. CR2	Nom usuel	numéro ENSANGT
1	5.342 Or19b	ENSANGT0000028755
2	2.283 Cyp9f2	ENSANGT0000024595
3	2.157 T48	ENSANGT0000002792
4	2.151 LvsS	ENSANGT0000017890
5	2.136 gb:BM610329	
6	2.132 ENSANGT0000016562	ENSANGT0000016562
7	2.097 gb:BM648782	
8	2.047 daily	ENSANGT0000010385
9	2.041 ENSANGT0000000312	ENSANGT0000000312
10	2.011 CG13919	ENSANGT0000023982
11	2.008 CG15725	ENSANGT0000017754
12	1.948 REL2	ENSANGT0000020234
13	1.909 ENSANGT0000014108	ENSANGT0000014108
14	1.906 EG:BACR37P7.8	ENSANGT0000008225
15	1.892 gb:BM575445	
16	1.892 gb:AJ280678	
17	1.889 gb:AJ284001	
18	1.854 Rel	ENSANGT0000020147
19	1.842 ENSANGT0000029388	ENSANGT0000029388
20	1.838 stumps	ENSANGT0000018141
21	1.827 ENSANGT0000010584	ENSANGT0000010584
22	1.823 CG2508	ENSANGT0000014868
23	1.822 ENSANGT0000024240	ENSANGT0000024240
24	1.752 CG31531	ENSANGT0000011497
25	1.775 gb:AJ280306	
26	1.743 CG8232	ENSANGT0000027601
27	1.737 nahoda	ENSANGT0000009343
28	1.733 wb	ENSANGT0000029436
29	1.717 tam	ENSANGT0000008130
30	1.708 gb:BM625417	
31	1.703 CLIPB17	ENSANGT0000022148
32	1.699 CG5618	ENSANGT0000014813
33	1.699 ENSANGT0000018186	ENSANGT0000018186
34	1.686 gb:AJ284404	
35	1.672 ENSANGT0000019251	ENSANGT0000019251
36	1.651 nAcRalipha-34E	ENSANGT0000022977
37	1.642 gb:BM627319	
38	1.642 gb:AL930953	
39	1.642 CG7814	ENSANGT0000019871
40	1.641 gb:AJ284668	
41	1.638 CG10264	ENSANGT0000018335
42	1.629 CG31812	ENSANGT0000010953
43	1.629 Sodh-2	ENSANGT0000011378
44	1.622 sbb	ENSANGT0000021762
45	1.622 gb:AJ284019	
46	1.615 gb:BX628707	
47	1.604 gb:AJ283312	
48	1.599 CG6606	
49	1.596 CLIPC4	ENSANGT0000019884
50	1.596 gb:BM634387	ENSANGT0000023378
51	1.594 ENSANGT0000022327	ENSANGT0000022327
52	1.592 ENSANGT0000021146	ENSANGT0000021146
53	1.591 ENSANGT0000015870	ENSANGT0000015870
54	1.581 ENSANGT0000021063	ENSANGT0000021063
55	1.574 ENSANGT0000013410	ENSANGT0000013410
56	1.571 gb:AL930133	
57	1.571 GSTd11	ENSANGT0000013097
58	1.568 gb:BX623082	
59	1.565 CG3342	ENSANGT0000017749
60	1.563 gb:AJ285389	

Tableau A.4. Les gènes cibles de Rel2 et de la cassette Cactus/Rel2, dépendants aussi de Rel1



Le moustique *Anopheles gambiae* est le vecteur principal du paludisme dont l'agent *Plasmodium* tue chaque année un million d'enfants. L'objet de cette thèse a été d'étudier la régulation de la réponse immunitaire de ce moustique grâce aux données fournies par le séquençage du génome de l'anophèle en 2002. Nous avons pu démontrer que les cascades de type NF- κ B, connues pour être impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire de l'insecte modèle drosophile, sont conservées chez l'anophèle. Nous avons mis en évidence le rôle de la cascade Rel1 dans la réponse déclenchée suite à une infection fongique, et le rôle de la cascade Rel2 dans la production des peptides antimicrobiens. Nous avons démontré le rôle des facteurs de transcription de type NF- κ B Rel1 et Rel2 dans la régulation de la transcription basale d'un certain nombre de gènes aux propriétés antiparasitaires et nous avons établi le rôle crucial de cette expression basale lors de la défense contre l'infection par *Plasmodium berghei*. En effet, nous avons pu bloquer la progression de *P. berghei* et ainsi rendre les anophèles réfractaires à ce parasite en augmentant cette immunité basale par l'inactivation du gène codant pour le répresseur de type κ B, Cactus. C'est la première fois qu'un tel phénotype a pu être obtenu par inactivation d'un gène. L'inactivation de *Cactus* est un outil puissant pour découvrir de nouveaux effecteurs impliqués dans la réponse immunitaire contre le *Plasmodium*.

Anopheles gambiae is the major vector for human malaria which kills one million children every year. Here we studied the regulation of immune responses of *Anopheles*, taking advantage of the recent (2002) sequencing of its genome. We could demonstrate that NF- κ B pathways are conserved between *Anopheles* and *Drosophila* (where they play a central role in immune responses). Moreover, we show that NF- κ B/Rel1 is involved in the antifungal responses and that NF- κ B/Rel2 is responsible for the antimicrobial peptides production. We demonstrated that Rel1 and Rel2 control the basal level of expression of antiparasitic genes such as *TEP1* and *LRIM1*. Boosting this basal level by κ B/Cactus silencing resulted in a complete blocage of parasite transmission, thus demonstrating the crucial role of basal immunity in the defense against *P. berghei*. This is the first demonstration of the role of basal immunity in antiparasitic defenses and *dsCactus* mosquitoes now constitute a new tool to study *Anopheles-Plasmodium* interactions and to identify genes involved in parasite killing.

