



HAL
open science

Articulations entre réponses locale et systémique dans les défenses antibactériennes de la Drosophile

Mathilde Gendrin

► **To cite this version:**

Mathilde Gendrin. Articulations entre réponses locale et systémique dans les défenses antibactériennes de la Drosophile. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : 2010PA066285 . tel-00814743

HAL Id: tel-00814743

<https://theses.hal.science/tel-00814743>

Submitted on 17 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Complexité du vivant

Présentée par

Mathilde GENDRIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Articulations entre réponses locale et systémique dans les défenses antibactériennes de la Drosophile

soutenue le 17 septembre 2010

devant le jury composé de :

M. Bruno LEMAITRE	Directeur de thèse
Mme Ylva ENGSTROM	Rapporteur
M. Alain ROUSSEL	Rapporteur
Mme Denise BUSSON	Examinatrice
M. Christian DOERIG	Examineur

Remerciements

Une aventure de quatre années touche à sa fin... voici le moment venu de remercier ceux qui m'ont accompagnée sur tout ou partie de cette route.

Je remercie d'abord les membres du jury de se montrer disponibles pour l'évaluation de ma thèse. Merci à mes rapporteurs, Ylva Engström et Alain Roussel et à mes examinateurs, Denise Busson et Christian Doerig. Merci à Denise Busson de représenter l'Université Paris 6 à Lausanne et de me permettre ainsi de soutenir ma thèse « à la maison ».

Pour continuer par le commencement, merci Bruno de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de ne pas avoir eu peur d'accepter une étudiante qui sortait d'une année loin des sciences. Du croisement de mouches à l'écriture d'article, j'ai vraiment profité d'un encadrement complet au cours de ma thèse et je suis consciente que c'est un cas rare. Ces années ont aussi été une aventure pour toi, avec le démarrage d'un nouveau laboratoire... Après un peu de scepticisme, je te suis également reconnaissante pour ce déménagement à Lausanne, dans un environnement scientifique très enrichissant et un cadre de vie très agréable!

David, merci pour ton aide, ta grande disponibilité que ce soit pour des questions d'anglais, de manip, de vie au labo... et pour tous les bons moments qu'on a pu partager. J'ai beaucoup apprécié de travailler en binôme avec toi pour finir le projet « infections génitales ». Dommage que le pays des pluies te rappelle si tôt au bercail ! Bonne chance avec les marmots...

En restant à Lausanne, merci Lionel et Olivia, vous qui avez prêté main forte à mes projets et permis de les faire avancer plus vite – ou moins lentement. Merci à tous les membres du laboratoire, j'ai eu la chance de pouvoir profiter de vos expertises diverses qui m'ont bien aidé au long de ma thèse. En particulier, merci Onya, Nicolas, Juan et David pour vos conseils avisés après avoir lu diverses parties de ma thèse. Et merci Onya pour les mails de soutien pendant la rédaction ! Merci aux membres de la plate-forme de micro-arrays pour nous avoir permis de percer... peut-être... le mystère de PGRP-LA, avec professionnalisme et efficacité. Et merci à ceux qui préfèrent les ordinateurs à la paille et qui sont toujours présents pour donner un coup de pouce : Armand, Mado et Swapna.

Partons pour Gif maintenant... Anna et Mickaël, je vous remercie de m'avoir formée aux techniques de bio mol du labo. Mickaël, tu as été infatigable à répondre à mes questions, jusqu'à Lausanne d'ailleurs, et je t'en suis

reconnaissante. Anna, merci pour m'avoir épaulée quand je t'ai suivie dans l'aventure des PGRP. Et comme une année sans chef, c'est un peu long, je voudrais remercier François et Isabelle pour s'être montrés toujours prêts à répondre à mes questions et à me conseiller en cas de besoin.

Merci aux personnes qui, à Gif et à Lausanne, ont rendu le travail possible en gérant le labo : Mickaël, Brigitte, Sabine, Aurélien, Jean-Philippe, Lionel, Geneviève, Véronique et Suzanne.

Je remercie aussi les chercheurs qui ont manifesté de l'intérêt quand j'ai eu l'occasion de présenter mes travaux de thèse en réunion de département et en séminaire GHI : c'est bon pour le moral ! Et en remontant un peu plus loin, je souhaite remercier mes encadrants de stages de recherche sans qui je ne me serai peut-être pas lancée dans cette thèse : Bertrand Muller, Marina Freudenberg et Catherine Bourgouin.

Face aux obstacles de la thèse, le quotidien n'aurait pas aussi facile s'il n'y avait pas eu les vendredis soirs Diekirch-croquisés avec Anna et Peter, les « get-together » avec Doruk, Nouara, Pierre, Asma, Xavier et Kashif, les pauses café avec Brigitte, Caro, Lydie, Audrey, Isabelle, les moments sportifs avec Christian le capoeiriste et Sophie, Arnaud et Lorène les coureurs, les grillades sur le bord du lac avec Jeremy, Onya, David, Juan, Quentin, Lionel, Olivier, Sveta, Claudine, Sophie et Swapna et les soirées de Noël avec tout le labo... Alors merci à tous pour ces bons moments partagés !

Et en dehors du labo, alors ! Il y a une vie !

Merci Pierre pour les bons moments passés à la coloc de Montrouge : les powpows, les discussions sur l'élaboration du pain, les bals trad'... et merci Andreas, Andi et Kaspar pour m'avoir accueillie dans celle d'Ecublens et enseigné des bases de schwiizer Dütsch.

Merci à Béa, Fanny et Céline pour les soirées tranquilles passées à Montrouge, Nogent, Alésia ou rue, euh, Garibaldi ? et à ma bonne vieille cops Clémence pour les week ends bredele – vide greniers.

Merci à mes parents pour m'avoir permis d'arriver jusque là, pour m'avoir encouragée à avancer sans me désigner *un* chemin. Merci Mouts d'avoir relu mes histoires de PGRGPRG en faisant bien attention à ne pas essayer de comprendre pour rester concentrée sur l'orthographe et la grammaire ! Merci aux autres « ma » de se réjouir de mon enthousiasme tout en me rappelant une certaine culture cinématographique : « Et... Ca intéresse quelqu'un, ça ? »

Et... merci à Gaëtan pour la vie qui est plus belle à deux, pour ton infatigable bonne humeur, pour ta façon de rêver la vie tout en gardant les pieds sur terre (tout est une question d'altitude).

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	5
Index des figures et tableaux	10
Abbréviations	11
Résumé	13
Summary	14
Introduction	15
I. Un organisme sain : un écosystème en équilibre	15
A. Un organisme-écosystème met en jeu des interactions variées	15
B. Le système immunitaire maintient l'équilibre de cet écosystème	17
1) Immunités innée et adaptative.....	17
2) L'initiation de la réponse.....	18
a) Historique : de la théorie des germes aux modèles d'initiation de la réponse	18
b) Une vision actualisée des modèles de C. Janeway et P. Matzinger	19
II. Un hôte modèle, la Drosophile.....	20
A. Le choix du modèle : histoire et perspectives.....	20
1) La Drosophile et son milieu de vie	20
2) <i>Drosophila melanogaster</i> , une mouche de laboratoire	20
3) Un modèle insecte d'interactions hôte-pathogènes	21
a) Dans une perspective de lutte anti-vectorielle.....	21
b) Dans une perspective de maintien d'Insectes utiles à l'Homme	22
4) Un hôte pour des espèces diverses	22
a) Dans un contexte non infectieux	22
b) Dans un contexte infectieux.....	23

B.	Les barrières à l'intrusion microbienne	25
1)	Des barrières physiques	25
2)	Des barrières chimiques et biochimiques	27
III.	La réponse immunitaire systémique	28
A.	L'immunité cellulaire	28
B.	L'immunité humorale.....	31
1)	Les peptides antimicrobiens (AMP).....	31
2)	Une induction contrôlée par les voies Toll et Imd	31
a)	La voie Toll répond aux infections fongiques ou de bactéries à Gram-positif.....	32
b)	La voie Imd répond aux infections par des bactéries à Gram-négatif	32
3)	L'initiation des voies Toll et Imd	34
4)	Le peptidoglycane bactérien et sa reconnaissance	36
a)	Structure du peptidoglycane	36
b)	Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP)	38
C.	Réponses intégrant des composantes humorales et cellulaires	40
1)	La mélanisation.....	40
2)	La coagulation.....	40
D.	Le rétrocontrôle négatif de la réponse.....	42
a)	Au niveau de la détection des MAMP	42
b)	Au niveau de la transduction du signal	43
c)	Au niveau de la stabilité des messagers	44
IV.	La réponse immunitaire locale	44
A.	Une réponse autonome par la cellule infectée	44
1)	La destruction de tout ou partie de la cellule infectée	44
2)	L'interférence ARN	46

B.	La réponse à l'infection épithéliale	48
1)	Un modèle bien caractérisé: la réponse dans l'intestin après infection orale bactérienne.....	48
a)	Une réponse en plusieurs étapes	48
b)	Une réponse hautement régulée	50
2)	La réponse locale dans divers épithélia.....	51
a)	Au niveau de l'appareil génital.....	51
b)	Au niveau des trachées	51
c)	Au niveau des glandes salivaires.....	52
3)	Complémentarité entre immunités locale et systémique.....	53
a)	Une régulation bien différente	53
b)	Intérêt de la compartimentalisation	53
V.	Le dialogue entre réponses locale et systémique	54
A.	Le dialogue entre intestin et corps gras	54
1)	Un signal transmis par les hémocytes	54
2)	La translocation de peptidoglycane.....	56
3)	Un rôle pour l'oxyde nitrique ?	56
4)	Synthèse sur le dialogue intestin – corps gras	57
B.	Le dialogue entre trachées et intestin.....	57
	Contexte et objectifs de cette thèse.....	58
	Resultats	60
I.	Etude de l'activation à distance de la réponse systémique au moyen d'un nouveau mode d'infection.....	60
A.	Introduction	60
B.	Article : Long-Range Activation of Systemic Immunity through Peptidoglycan Diffusion in Drosophila.....	61
C.	Mechanisms underlying peptidoglycan diffusion upon genital infections	74

II. Caractérisation de la fonction de PGRP-LA	77
A. Introduction	77
B. Manuscrit : PGRP-LA promotes basal antibacterial defense in Drosophila barrier epithelia	77
Abstract	78
Introduction	79
Results	81
Discussion.....	88
Materials and methods.....	90
Accession Numbers.	93
Acknowledgements.....	93
Figure legends	94
C. A role for PGRP-LA in the salivary glands ?	108
Discussion	110
I. La régulation épithéliale des gènes encodant les AMP	110
A. En absence d'infection	110
1) La production constitutive de la Cécropine dans le canal éjaculateur.....	110
2) La production basale des AMP dans les trachées	111
B. Induite par l'infection	112
1) Dans les trachées.....	112
a) La réponse immunitaire dans les trachées: un nouveau mode d'infection	112
b) Induction des gènes codant les AMP sous le contrôle de la voie Imd	113
2) Dans l'appareil génital	114
3) Dans les glandes salivaires	114
4) Les dénominateurs communs de la réponse épithéliale	115
C. Une régulation tissulaire fine	115
II. Une analyse globale de la réponse immunitaire trachéenne.....	117

A.	Induction de gènes impliqués dans l'immunité et la détoxification	117
B.	Répression de gènes encodant des protéines cuticulaires.....	118
III.	Les dialogues entre épithélia barrières et corps gras	119
A.	Le dialogue tractus génital-corps gras.....	119
B.	Le dialogue glandes salivaires-corps gras.....	120
C.	Synthèse sur les dialogues épithélia-corps gras.....	121
IV.	Les fonctions des PGRP	122
A.	PGRP-LA, entre réponse épithéliale et réponse systémique	122
B.	Etat de lieux sur l'étude des PGRP de Drosophile	123
1)	Les PGRP récepteurs	123
2)	Les PGRP régulateurs.....	124
3)	Les PGRP « mystérieux »	125
C.	Les fonctions des PGRP chez les Métazoaires	130
1)	Les PGRP récepteurs	130
2)	Les PGRP régulateurs.....	130
3)	Les PGRP effecteurs	131
	Conclusion	131
	Bibliographie	132

Index des figures et tableaux

Figures

Introduction

Figure 1. Méthodes d'analyse de la réponse immunitaire de la Drosophile

Figure 2. Structure des appareils de la Drosophile qui contiennent des épithélia barrières

Figure 3. Les sept familles de peptides antimicrobiens de la Drosophile

Figure 4. Activation de l'expression des gènes encodant les AMP par les voies Toll et Imd

Figure 5. Structures des enveloppes bactériennes

Figure 6. Fonctions des PGRP dans la réponse immunitaire de la Drosophile

Figure 7. Régulation négative de la voie Imd

Figure 8. L'interférence ARN

Figure 9. L'expression épithéliale des peptides antimicrobiens

Figure 10. les dialogues entre épithélia et corps gras dans la réponse immunitaire

Résultats

Figure 11. Analysis of the way of translocation of the peptidoglycan upon genital infection

Figure 12. Analysis of the effect of LA^{2A} mutation in the region of the salivary glands

Tableau

Revue bibliographique sur les PGRP de Drosophile

Abbreviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AMP : antimicrobial peptide
ARN : Acide ribonucléique
da-Gal4 : daughterless-Gal4
CD : Cluster of Differentiation
DAMP : Damage-associated molecular patterns
DAP : acide méso-DiAminoPymélique
Duox : Dual Oxidase
dUSP36 : Drosophila Ubiquitin Specific Protease 36
Ecc15 : *Erwinia carotovora carotovora* 15
GFP : Green Fluorescent Protein
GlucNAc : N-acétylglucosamine
GNBP : Gram-Negative Binding Protein
GI: Genital infections
Imd: Immune deficiency
IRC : Immune Responsive Catalase
JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
L-NAME : N (G)-nitro-L- arginine methyl ester
MAMP : Microbe-associated Molecular Pattern
ModSP : Modular Serine Protease
MurNAc : Acide N-acétylmuramique
Myd88 : Myeloid differentiation primary response gene 88
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB : Nuclear Factor-κB
NK : Natural Killer
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOS : Nitric Oxide Synthase
PAMP : Pathogen-Associated Molecular
PG : Peptidoglycane
PGRP ou **PLYRP** : PeptidoGlycan Recognition Protein
PGRP-L : PGRP-Long
PGRP-S : PGRP-Short

pims : PGRP-LC-interacting Inhibitor of Imd Signalling
pirk : Poor IMD Response upon Knock-in
proPO : prophénoloxydase
PRR : Pattern Recognition Receptor
RT-qPCR : real time quantitative polymerase chain reaction
RHIM : RIP homotypic interaction motif
RIP : Receptor Interacting Protein
SPE : Spätzle Processing Enzyme
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
Tak : TGF β -Activated Kinase
TCT : Tracheal Cytotoxin
TEP : ThioEster containing Proteins
TLR : Toll-like receptor
UAS : Upstream Activating Sequence
wt : wild-type
YFP : Yellow Fluorescent Protein

Résumé

Le système immunitaire assure le maintien de l'intégrité de l'organisme, luttant notamment contre les infections. Durant ma thèse, j'ai étudié la réponse immunitaire locale et ses liens avec la réponse systémique chez la *Drosophile*.

La réponse systémique, à l'échelle de l'organisme, est induite dans le corps gras en présence de bactéries dans la cavité générale et la réponse locale a lieu en cas d'accumulation de bactéries au contact d'un épithélium. Certaines infections locales, par voie orale, induisent à la fois une réponse locale et une réponse systémique, en absence de bactéries dans la cavité générale : cela implique l'envoi d'un signal au corps gras par l'intestin. Il a été proposé que ce signal serait le peptidoglycane bactérien diffusant à travers l'intestin.

Ma thèse est constituée de deux projets. D'une part, j'ai caractérisé un mode d'infection locale, par voie génitale, induisant une réponse locale et systémique. Par dépôt génital de peptidoglycane, j'ai mis en évidence que cette molécule est le signal induisant la réponse systémique. Selon des données préliminaires, elle diffuserait par transcytose.

D'autre part, j'ai étudié la fonction de PGRP-LA. Les PGRP sont des régulateurs et des effecteurs de la réponse immunitaire chez les animaux. L'analyse du transcriptome de trachées larvaires suggère que PGRP-LA participe au maintien d'un niveau basal d'immunité locale. Selon des résultats préliminaires, il serait impliqué dans la réponse du corps gras attendant aux glandes salivaires.

Ma thèse apporte donc des informations sur la réponse immunitaire dans les trachées et l'appareil génital et sur la communication entre épithélium génital ou salivaire et corps gras.

Summary

Cooperation between local and systemic responses in the antibacterial defenses of *Drosophila*

An immune system protects organisms against infections. During my PhD, I have focused on the local immune responses of *Drosophila* and on their links with the systemic immune response.

The systemic response is induced in the fat body by the presence of bacteria in the body cavity while the local response is initiated when bacteria accumulate within an epithelial tissue. Some local gut infections however have been shown to also induce systemic responses in the absence of bacteria in the body cavity. Thus, a signal from the gut is detected by the fat body. It has been proposed that bacterial peptidoglycan, passing across the gut epithelium, could be this signal.

In the first project of my PhD, I characterized a new, genital, mode of infection that induces both a local response of the genital tract and a systemic fat body response. Experiments based on genital deposition of peptidoglycan reveal that this molecule is the signal that passes from the genital tract to the fat body. Preliminary results suggest that its passage requires transcytosis.

In my second project, I investigated the function of PGRP-LA. PGRPs are regulators and effectors of the immune response in animals. A transcriptome analysis in larval tracheae suggests that PGRP-LA is involved in the maintenance of a basal level of immune response in healthy conditions. Preliminary results suggest that PGRP-LA is also required for a localised response of the fat body surrounding the salivary glands.

These studies provide new insights into the immune responses of the tracheae and genital tract and into the communication between barrier epithelia, specifically the salivary glands and the genital tract, and the fat body.

Introduction

I. Un organisme sain : un écosystème en équilibre

A. Un organisme-écosystème met en jeu des interactions variées

Un écosystème est l'ensemble formé par une communauté d'êtres vivants et son environnement, avec lequel et dans lequel les espèces interagissent. Cette définition peut être transposée à l'échelle d'un organisme, qui devient alors un environnement pour la flore qu'il abrite. Chez l'Homme, l'intestin contient 500 à 1000 espèces bactériennes¹(Dethlefsen et al., 2007), et la peau, les épithélia génital et respiratoire sont en contact permanent avec des bactéries. La présence de microbes au niveau des muqueuses n'implique cependant pas un contexte infectieux : on parlera d'infection pour désigner une situation dans laquelle des microbes se multiplient chez l'hôte de façon invasive et, par là-même, lui causent des dommages. Ces microbes sont alors dits pathogènes pour leur hôte.

A l'inverse, il existe des relations hôte-microbes qui peuvent bénéficier à l'un comme à l'autre: les symbioses². Une symbiose particulièrement étudiée est celle de l'association entre la Seiche *Euprymna scolopes* et la bactérie luminescente *Vibrio fisheri*. La Seiche fournit un environnement et probablement des facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de leurs symbiotes, alors que les symbiotes, quand ils atteignent un seuil de concentration, émettent une lumière dont l'animal tire bénéfice pour la chasse, de nuit. Cette association entre *E. scolopes* et *V. fisheri* est très spécifique : la Seiche est en contact permanent avec des centaines d'espèces bactériennes présentes dans l'eau de mer, mais *V. fisheri* est la seule espèce colonisant ses épithélia. De plus, des études

¹ Une espèce bactérienne est considérée ici comme un groupe phylogénétique dont les séquences d'ADN codant les ARN ribosomiques 16s divergent de moins de 3%

² Selon l'acception francophone, une symbiose est une interaction entre deux espèces maintenue pendant une majeure partie du cycle de vie et bénéficiant à chacun de ses membres, appelés symbiotes. La définition anglophone n'implique pas nécessairement de bénéfice réciproque.

impliquant des bactéries *V. fisheri* mutantes incapables de produire de la lumière ont montré que la luminescence est un caractère nécessaire au développement de la communauté bactérienne (Koropatnick et al., 2007). Comme lors d'une infection, cette interaction est bien une colonisation d'une cavité de l'hôte par le microbe, mais dont l'hôte ne se débarrasse pas car, au terme d'un processus évolutif, elle lui est devenue bénéfique. L'hôte régule cependant la population bactérienne, notamment en expulsant la majeure partie de la population bactérienne chaque matin.

Quant à la flore intestinale des Mammifères, elle a d'abord été considérée comme commensale (étymologiquement, « qui partage la table »), c'est-à-dire ni favorable ni néfaste pour son hôte : elle se développe en effet dans un environnement régulé, riche en nutriments, sans lui être indispensable. Cependant, plusieurs effets de la flore ont été mis en évidence. Notamment, si elle ne lui est pas vitale, elle a tout de même un rôle de protection contre les pathogènes, par effet de « résistance à la colonisation », c'est-à-dire par utilisation de l'espace et des ressources d'un éventuel pathogène (Stecher et al., 2010). De plus, elle aiderait à la digestion et à la mise en place d'un système immunitaire fonctionnel : selon une étude récente réalisée sur la Souris, la flore intestinale serait nécessaire au développement d'une partie des plaques de Peyer, des tissus lymphoïdes intestinaux (Bouskra et al., 2008). Par ailleurs, il a été proposé que le succès de colonisation d'une nouvelle espèce bactérienne au sein de la flore dépendrait de l'abondance en bactéries phylogénétiquement proches déjà présentes. Cet effet peut se révéler néfaste à l'hôte, dans un cadre infectieux, ou bénéfique, lors de l'inoculation d'une bactérie probiotique (Stecher et al., 2010). Ainsi, un hôte et des microbes peuvent établir des interactions variées, pouvant mener à l'établissement d'une symbiose, au développement d'une infection ou à une cohabitation commensale. A l'exemple des associations Seiche-Vibrio et Souris-flore, certaines interactions sont prédictibles comme bénéfiques, alors que d'autres différeront selon les conditions.

Un hôte sain n'est donc pas un organisme évoluant dans un environnement stérile mais un individu dont l'écosystème est en équilibre. Cet équilibre n'est pas stable mais dynamique et peut être rompu par l'un ou l'autre des partenaires : c'est le cas du développement non régulé d'un microbe, lors d'une infection, ou de la perte de contrôle par l'hôte, dans des cas d'immunodépression ou lors de la mort. Il existe donc un système de contrôle qui maintient l'équilibre de l'association : le système immunitaire.

B. Le système immunitaire maintient l'équilibre de cet écosystème

Le système immunitaire préserve l'intégrité de l'organisme contre la décomposition par les micro-organismes qui le peuplent, mais aussi contre des dangers intrinsèques, tels que le développement de cellules cancéreuses. Chez les Vertébrés, il a deux composants principaux, agissant de concert : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Toutes deux sont activées quand des récepteurs reconnaissent spécifiquement des molécules témoignant d'une infection. Elles induisent alors une réponse immunitaire, c'est-à-dire une cascade d'événements impliquant une ou plusieurs cellules et aboutissant à l'activation ou la production d'effecteurs antimicrobiens de natures diverses.

1) Immunités innée et adaptative

L'immunité adaptative est caractérisée par la capacité qu'ont certaines de ses cellules, les lymphocytes, à recombinaison aléatoirement plusieurs modules présents dans les gènes encodant leurs récepteurs. Le répertoire de lymphocytes qui en résulte est une mosaïque de cellules dont le génome lui-même est légèrement différent. Le mécanisme de recombinaison est à l'origine d'une diversité de récepteurs bien plus vaste que celle présente initialement dans le génome. Un lymphocyte donné est présent en faible nombre dans l'organisme, et sa sélection par reconnaissance de son ligand spécifique et de signaux d'activation engendrera son amplification clonale, à l'origine de cellules effectrices et de cellules mémoires. L'organisme gardera donc la mémoire de ce ligand, ce qui lui confèrera la capacité de réagir plus rapidement à une infection identique. Cette immunité se développe au fil du temps en fonction du vécu de l'individu, ce qui explique son qualificatif d'immunité adaptative. L'immunité innée, elle, est présente dès la naissance. Ses récepteurs sont encodés par le génome et leur diversité est plus réduite. La spécificité de la réponse innée provient d'une adaptation à l'échelle de l'évolution et non de la vie d'un individu.

Si les immunités innée et adaptative sont activées par des étapes analogues (reconnaissance, transduction d'un signal et production ou activation d'effecteurs), elles présentent cependant des distinctions majeures. D'une part, l'immunité innée est présente dans l'ensemble des phyla animal et végétal et ses principaux composants sont conservés parmi les animaux, alors que l'immunité adaptative est une spécificité des Vertébrés, c'est-à-dire moins de 0,1% des espèces animales connues. D'autre part, les processus de mise en place de l'immunité adaptative sont considérablement plus lents que ceux de l'immunité

innée, ce qui fait de cette dernière la première barrière contre toute infection. En effet, certains composants de la réponse innée sont activés dans les premières minutes de l'infection, alors que la mise en place de la réponse adaptative dure environ une semaine chez l'Homme. Enfin, la réponse adaptative dépend de la réponse innée, qui participe à son activation et son orientation. Paradoxalement, au cours du XX^e siècle, l'étude de la réponse adaptative, par exemple la caractérisation de ses récepteurs et de ses voies d'activation, a eu beaucoup d'avance sur celle de la réponse innée.

Ainsi, les réponses immunitaires sont activées en recevant des signaux d'infection. Au vu de la présence continue de bactéries au contact de l'organisme, une des fonctions du système immunitaire est de distinguer une situation saine, qu'il tolère, d'une situation infectée, à laquelle il induit une réponse.

2) L'initiation de la réponse

a) Historique : de la théorie des germes aux modèles d'initiation de la réponse

Selon la théorie des germes, formulée au XIX^e siècle, une maladie est la conséquence de la présence de microbes dans l'organisme. Proposée par Louis Pasteur, cette hypothèse a été confirmée expérimentalement par Robert Koch dans le cas de l'anthrax. Au XX^e siècle s'est développée l'idée que la réponse immunitaire était déclenchée par la réponse de "non-soi" par le système immunitaire. Petit à petit, certaines observations ont laissé des questionnements dans l'élaboration d'une définition claire du "soi" et du "non-soi". La flore intestinale fait-elle partie du soi puisqu'elle ne déclenche pas de réponse ? Pourquoi des récepteurs de lymphocytes détectent-ils, lors d'analyses *in vitro*, des molécules du soi telles que la kératine ou l'ADN ? (Matzinger, 1994) Ces problèmes ont mené à la proposition de deux modèles d'induction de la réponse immunitaire, dans les années 1980-90.

D'une part, Charles Janeway propose en 1989 que le modèle général soi/non-soi a atteint ses limites et doit être revisité (Janeway, 1989). Selon lui, l'acteur principal de l'induction d'une réponse immunitaire est le système immunitaire inné. Des motifs microbiens conservés, qu'il nomme Pathogen-Associated Molecular Patterns ou PAMP, seraient reconnus par des récepteurs spécifiques, les Pattern-recognition Receptors ou PRR. Ainsi selon Janeway, c'est

la reconnaissance d'un nombre limité de motifs spécifiques aux pathogènes qui va faire la différence entre un contexte infecté et un contexte sain.

D'autre part, Polly Matzinger propose en 1994 le modèle du danger (Matzinger, 1994). Ce ne serait pas la reconnaissance de soi ou de non-soi qui serait maîtresse dans l'induction d'un système immunitaire, mais la présence de "signaux de danger", qu'elle nommera plus tard danger-associated molecular patterns ou DAMP, qui peuvent aussi bien provenir du soi que du non-soi (Matzinger, 2002).

b) Une vision actualisée des modèles de C. Janeway et P. Matzinger

Chacun de ces modèles a reçu des confirmations et des limitations. Comme l'a postulé C. Janeway, il existe des récepteurs reconnaissant des motifs conservés dans chaque classe de microbes. Ainsi, le lipopolysaccharide et le Peptidoglycane, constituants majeurs de l'enveloppe bactérienne, sont reconnus chez l'Homme, respectivement par le récepteur Toll-like TLR4 et les récepteurs NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing) (Philpott and Girardin, 2004). Comme ces motifs microbiens ne sont pas spécifiques aux pathogènes, mais présents plus généralement chez certaines classes de micro-organismes, on les désigne également par l'acronyme MAMP pour Microbe-Associated Molecular Patterns.

Par ailleurs, en concordance avec le modèle de P. Matzinger, il a été mis en évidence que la réponse immunitaire peut être stimulée par des molécules dont la présence dans l'espace intercellulaire signe une atteinte à l'intégrité du tissu. C'est notamment le cas de l'ADN, normalement intracellulaire, ou de l'acide urique, libéré par les cellules nécrotiques (Kono et al., 2010). Ces signaux, plus que des signaux de danger, témoignent de dommages des tissus, on parlera donc aujourd'hui de DAMP pour Damage-Associated Molecular Patterns, généralement pour désigner des signaux de danger endogènes.

Plusieurs mécanismes, mis en évidence récemment, participent également à établir la limite entre tolérance de la flore et déclenchement d'une réponse à l'infection. Les récepteurs sont notamment localisés dans des régions non colonisées par la flore, telles que les cryptes intestinales. De plus, des régulateurs négatifs de la réponse empêchent de façon active son induction dans des conditions non infectées et introduisent un seuil de tolérance au delà duquel la réponse immunitaire est déclenchée. (Zaidman-Remy et al., 2006) (voir plus loin).

Afin de décrire plus précisément l'immunité innée, les concepts seront principalement abordés ici en s'intéressant au modèle de la Drosophile, utilisée

comme animal modèle dans cette étude. Certaines particularités d'autres animaux seront abordées également, au fur et à mesure. La section suivante vise donc à présenter l'animal modèle qu'est la Drosophile, et à présenter quelques caractéristiques expérimentales et anatomiques impliquées dans l'étude de la relation hôte-microbes.

II. Un hôte modèle, la Drosophile

A. Le choix du modèle : histoire et perspectives

1) La Drosophile et son milieu de vie

De nombreux modèles biologiques ont été choisis parmi les organismes qui vivent naturellement avec l'Homme : c'est le cas de la Souris, envahissant les caves, de l'Arabette des dames, une "mauvaise herbe", d'*Escherichia coli*, une bactérie présente dans l'intestin humain, et également du sujet de cette étude, la Drosophile.

La Drosophile, étymologiquement "celle qui aime la rosée" tient son nom de son cycle d'activité quotidien, principalement le matin et le soir. Elle est également appelée mouche du vinaigre en français, et mouche des fruits en anglais, terme qui décrit mieux son milieu de vie naturel. En effet, la Drosophile vit au contact de fruits très mûrs ou en voie de putréfaction, sur lesquels la femelle pond et qui serviront de milieu pour le développement de ses larves.

2) *Drosophila melanogaster*, une mouche de laboratoire

Le genre *Drosophila* compte plus de 1500 espèces, mais *Drosophila melanogaster* est de loin la plus étudiée en biologie : par conséquent, l'utilisation des termes "la Drosophile" réfère en général à cette espèce. Ce modèle animal, étudié depuis plus d'un siècle, a d'abord été choisi pour son élevage pratique et bon marché, son cycle de vie court (10 jours à 25°C) et son caryotype simple (4 paires de chromosomes). Il présente actuellement des avantages supplémentaires, liés à l'expertise accumulée au fil du temps en termes de savoir et de techniques d'étude : le génome est séquencé, de nombreux gènes ont été caractérisés et leurs mutants mis à disposition, des techniques de mutagenèse et d'observations ont été mises au point par la large communauté des Drosophilistes, qui communique notamment par le biais d'une base de données internationale très riche.

Historiquement, la *Drosophile* a été d'abord un modèle pour étudier la transmission des caractères, en particulier par Thomas Morgan, et la nature des mutations, notamment par Hermann J. Muller, puis pour la génétique du développement et quelques autres domaines tels que la neurobiologie, le comportement, la génétique des populations. Le domaine des interactions entre hôtes et microbes chez la *Drosophile* a pris de l'essor dans les années 1990.

3) Un modèle insecte d'interactions hôte-pathogènes

Les Insectes sont des animaux peuplant tous les milieux de vie, terrestre ou aquatique, sous presque tous les climats. Avec plus d'un million d'espèces décrites, ils représentent environ les deux tiers des espèces animales connues. Leurs rapports avec l'Homme sont divers : si certains lui sont utiles, en particulier en tant que pollinisateurs ou source d'alimentation, d'autres sont également vecteurs de maladies ou dévastateurs de récoltes ou d'habitats.

a) Dans une perspective de lutte anti-vectorielle

A l'heure actuelle, les maladies transmises par les Insectes constituent une des menaces pour les populations humaines. Parmi ces maladies, le paludisme ou malaria est la plus meurtrière, tuant 1 à 2 millions de personnes par an, principalement des enfants de moins de 5 ans et des femmes enceintes. Le paludisme est dû à une infection par un parasite du genre *Plasmodium*, qui est transmis par des moustiques du genre *Anopheles*. Le parasite, ingéré lors d'un repas de sang, réalise toute une partie de son cycle de développement au contact de divers tissus du moustique. Si ce cycle n'est pas bloqué par l'immunité du moustique, il aboutit à la colonisation des glandes salivaires par des formes infectieuses pour l'Homme, les sporozoïtes, au bout d'une dizaine de jours. Ces derniers seront injectés à l'Homme lors d'une piqûre (Lavazec and Bourgouin, 2008).

Certaines stratégies de lutte contre des maladies transmises par des Insectes visent à interrompre le cycle de l'agent infectieux chez son vecteur. Ceci est réalisé par l'utilisation d'insecticides ou de moustiquaires, mais d'autres stratégies visent au blocage biologique du cycle, par l'utilisation de vaccins humains anti-transmission, de moustiques transgéniques réfractaires à l'agent infectieux, ou de bactéries rendant l'Insecte résistant à l'infection (Lavazec and Bourgouin, 2008). Les principaux vecteurs de maladies sont donc étudiés afin d'élucider les interactions entre l'Insecte hôte et l'agent infectieux. Ces études sont notamment orientées par les connaissances plus approfondies sur la

Drosophile, certains mécanismes étant conservés entre ces espèces apparentées (Schneider, 2000). En particulier, il a été récemment rapporté que les bactéries à transmission verticale du genre *Wolbachia* protégeaient la Drosophile contre certaines infections virales (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Cette découverte a ouvert de nouvelles perspectives en termes de lutte contre les virus transmis par des Insectes : en particulier, *Wolbachia* induit une résistance au virus de la Dengue chez *Aedes aegypti* (Bian et al., 2010; Moreira et al., 2009), et des tests à grande échelle, actuellement en cours, devraient aboutir à une libération de moustiques infectés par *Wolbachia* en Australie dès la fin de l'année 2010 (O'Neill, 2010).

b) Dans une perspective de maintien d'Insectes utiles à l'Homme

Si certains Insectes sont ou transportent des fléaux pour l'Homme, d'autres lui sont utiles. Ainsi, la production de 84% des espèces cultivées en Europe dépend directement des pollinisateurs, principalement l'Abeille. Le ver à soie et la cochenille sont utilisés en industrie textile, et plus de 1400 espèces d'Insectes participent à l'alimentation humaine à travers le monde. Enfin, les larves de certaines mouches sont utilisées en maggothérapie pour guérir des blessures : les asticots nettoient la plaie en se nourrissant de la chair morte et sécrètent des peptides antimicrobiens, qui la désinfectent. Ces Insectes utiles et leurs maladies font également l'objet d'études scientifiques. A titre d'exemple, les causes du syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (Colony Collapse Disorder), observé ces dernières années en Europe, au Japon et aux Etats-Unis, ne sont pas encore clairement définies (Ratnieks and Carreck). Ce phénomène consiste en la désertion des ruches par les ouvrières, provoquant la mort de la colonie. Il découlerait de causes multiples associant des infections virales et parasitaires, la colonisation de ruches par des Acariens, les effets de certains pesticides sur les Abeilles et des carences alimentaires. La part de chacune de ces causes et les effets de leur combinaison sont en cours d'étude.

4) Un hôte pour des espèces diverses

a) Dans un contexte non infectieux

La flore bactérienne de la Drosophile a été étudiée par des techniques de culture bactérienne et de séquençage de gènes codant l'ARN ribosomique 16S : elle serait composée d'environ 50 espèces, appartenant principalement aux

Firmicutes – bactéries à Gram-positif – et aux Protéobactéries – bactéries à Gram-négatif (Cox and Gilmore, 2007).

Parmi ces bactéries, certaines colonisent l'intestin, d'autres des tissus divers. En particulier, certaines pénètrent dans l'œuf au cours de son développement et sont transmises de la femelle à sa descendance. C'est le cas des endosymbiontes des genres *Wolbachia* et *Spiroplasma*, qui sont notamment étudiés pour l'effet manipulateur qu'ils exercent sur la reproduction de leur hôte, favorisant le succès reproductif des femelles infectées et donc la transmission de la bactérie. Plus particulièrement, *Wolbachia* induit de l'incompatibilité cytoplasmique : une femelle non infectée par cette bactérie ne peut pas se reproduire avec un mâle infecté, alors qu'une femelle infectée peut se reproduire avec un mâle infecté ou non (Mercot and Charlat, 2004). Quant aux Spiroplasma, ils induisent une létalité embryonnaire ou larvaire chez les mâles de la descendance infectée, réduisant ainsi la compétition auxquelles les femelles sont confrontées (Haselkorn, 2010).

b) Dans un contexte infectieux

En plus de ces bactéries présentes couramment chez la Drosophile, certains isolats provenant d'échantillons naturels ont été sélectionnés car ils induisent une réponse immunitaire et/ou de la létalité chez la mouche. On peut citer notamment la souche *Erwinia carotovora carotovora 15 (Ecc15)*, infectieuse mais non létale pour la Drosophile (Basset et al., 2000), et les espèces *Pseudomonas entomophila* et *Serratia marcescens*, dont l'infection est létale (Nehme et al., 2007; Vodovar et al., 2005). Ces trois espèces bactériennes, à Gram-négatif, appartiennent aux Gamma-Protéobactéries. D'autres bactéries, connues d'abord pour leur virulence sur l'Homme notamment, sont également pathogènes pour la Drosophile, et donc utilisées dans ce domaine de recherche.

Les infections expérimentales réalisées sur la Drosophile avec ces souches bactériennes ont pour objectifs d'étudier aussi bien la réponse immunitaire de la Drosophile que la virulence bactérienne. Elles sont effectuées soit par introduction directe de bactéries dans l'hémolymphe au moyen d'une aiguille, soit par voie orale (figure 1).

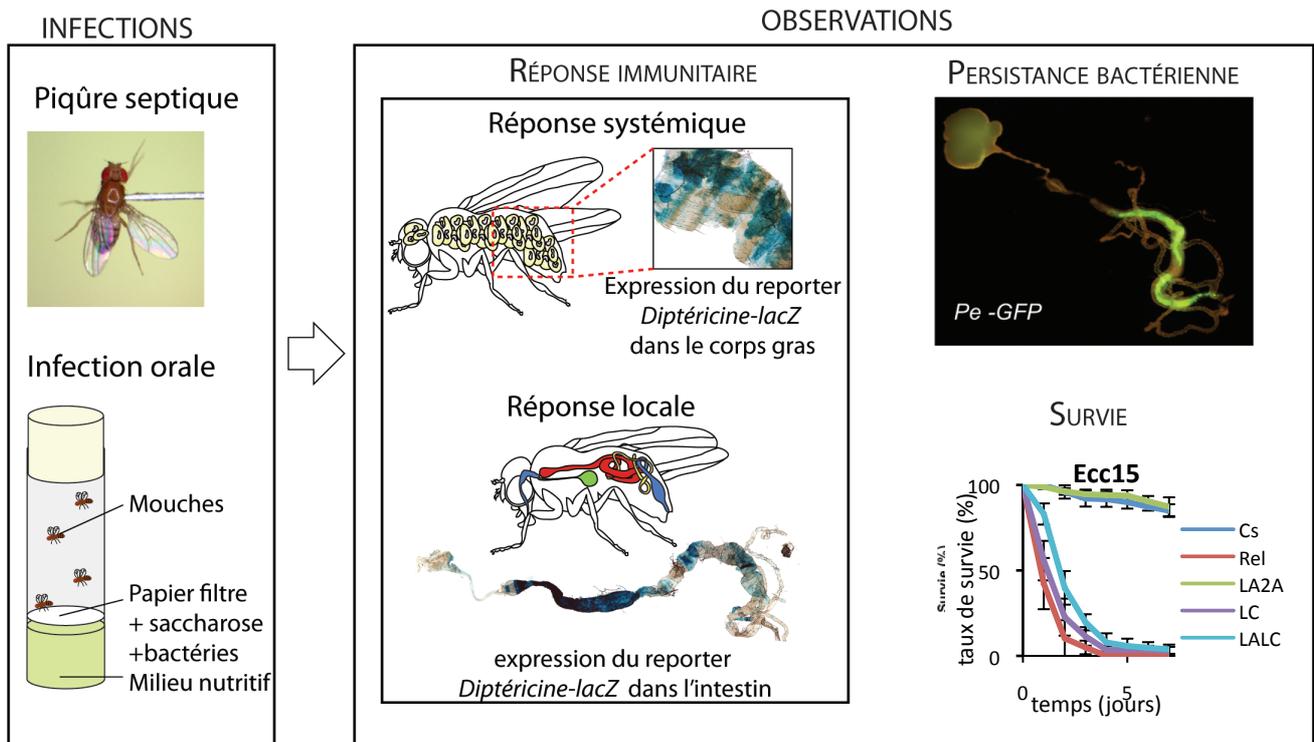


Figure 1: Méthodes d'analyse de la réponse immunitaire de la Drosophile

Les infections sont réalisées soit par piqûre avec une aiguille préalablement recouverte de culot bactérien, soit par ingestion par la mouche d'un mélange de culot bactérien et de solution de saccharose déposé sur un papier filtre recouvrant le milieu nutritif.

Les méthodes d'observations consistent à suivre d'une part la réponse immunitaire, en particulier la production d'AMP, et d'autre part les résultantes de l'infection, c'est-à-dire la persistance bactérienne et la survie des mouches. La production des AMP est suivie qualitativement par coloration révélant l'expression de gènes reporters, tels que *Diptéricine-lacZ* qui exprime la

β -galactosidase sous le contrôle du promoteur de la *Diptéricine*. Elle est quantifiée par PCR quantitative ou mesure de l'activité β -galactosidase en utilisant le même reporter. La persistance bactérienne est suivie en utilisant des bactéries fluorescentes, telles que *Pseudomonas entomophila*-GFP (Pe-GFP), ou par des méthodes plus quantitatives de décomptes de CFU ou de PCR quantitative. Enfin, la survie est réalisée en comptant régulièrement les mouches survivant à l'infection. (Réponse immunitaire: adapté de Broderick, 2009 ; Survie: exemple de survie après piqûre septique par *Ecc15*)

La *Drosophile* peut également être colonisée par des champignons, tels que *Beauveria bassiana*, une espèce dont les hyphes peuvent transpercer la cuticule, et se disséminer par la suite dans tout l'organisme (Lemaitre et al., 1997). Des virus infectieux pour la *Drosophile* ont également été identifiés et ils infecteraient 40% des souches naturelles (Huszar and Imler, 2008). Ils appartiennent tous aux virus à ARN. Certains, tels que le virus Sigma, sont transmis verticalement, tandis que d'autres, comme le Virus C de la *Drosophile* le sont horizontalement. Enfin, les larves de *Drosophile* peuvent être infestées par des guêpes parasitoïdes : les œufs pondus dans l'asticot se développent en larves qui tuent leur hôte en le dévorant (Carton et al., 1986).

La *Drosophile* est donc colonisée par diverses espèces bactériennes, virales, fongiques ou animales. Le développement d'une infection par ces envahisseurs potentiels dépend en particulier de l'intégrité des barrières qui les séparent de leur hôte.

B. Les barrières à l'intrusion microbienne

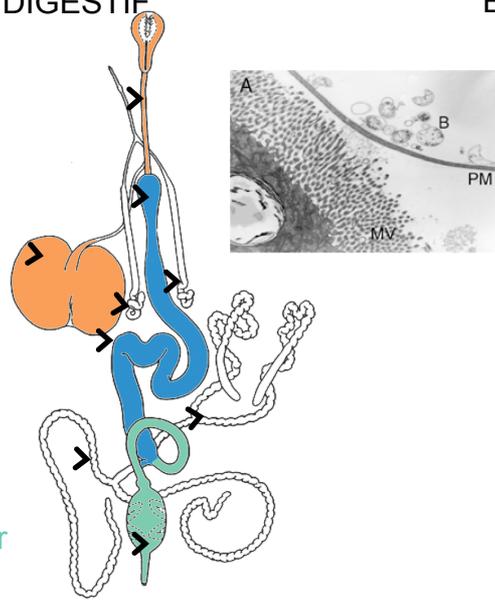
1) Des barrières physiques

Le premier constituant de l'organisme rencontré par un pathogène en est l'enveloppe, constituée d'un épithélium protecteur, dont la partie externe, l'épiderme, est renforcé. Chez la *Drosophile*, la cuticule est une épaisse couche de chitine synthétisée par l'épiderme, étanche et résistante à l'abrasion. Les épithélia internes tapissent les organes des appareils digestif, excréteur, génital et respiratoire. Comme l'épiderme, ils peuvent être recouverts par des structures protectrices, telles que l'intima, une fine cuticule recouvrant les épithélia dérivés de l'ectoderme embryonnaire (Demerec, 1950).

Chez la *Drosophile*, l'intestin est constitué de trois parties : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur (voir figure 2A). Tandis que les épithélia des régions antérieure et postérieure sont recouverts d'une intima, celui de l'intestin moyen est séparé de la lumière intestinale par une fine couche de chitine associée à des protéines, la matrice péritrophique. Celle-ci est fine et synthétisée en continu par les cellules du cardia, une région située en avant de l'intestin moyen. Il semble qu'après infection orale, la synthèse de matrice péritrophique soit accélérée, comme en témoigne l'activation de nombreux gènes codant ses composants (Buchon et al., 2009b).

A SYSTEME DIGESTIF

intestin
antérieur
cardia
crop
glandes
salivaires
intestin moyen
tubes de
Malpighi
intestin postérieur



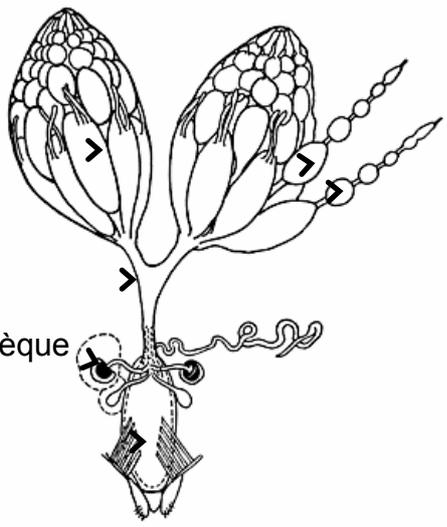
B SYSTEME RESPIRATOIRE

spiracles
antérieurs
troncs trachéens
trachées
spiracles
postérieurs



C APPAREIL REPRODUCTEUR FEMELLE MÂLE

ovaire
ovariole
s
oviducte
spermathèque
utérus



vésicule séminale
glande accessoire
testis
canal éjaculateur
bulbe éjaculateur

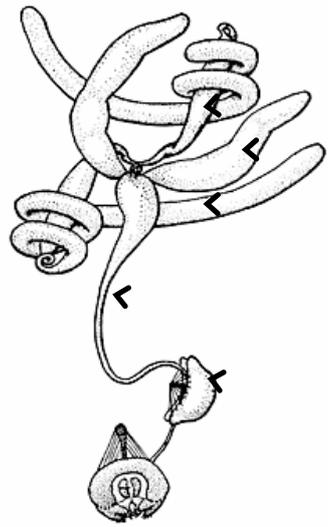


Figure 2: Structure des appareils de la Drosophile qui contiennent des épithélia barrières

A. Le système digestif est constitué de l'intestin et des glandes salivaires. L'intestin est séparé en trois parties: l'intestin antérieur (orange), l'intestin moyen (bleu) et l'intestin postérieur (vert). La nourriture ingérée est d'abord stockée dans le crop avant d'être envoyée dans l'intestin moyen. La matrice péritrophique (PM), visible en microscopie électronique, est synthétisée par certaines cellules du cardia, et recouvre l'épithélium de l'intestin moyen.

B. Chez la larve, le système respiratoire est constitué de 2 troncs trachéens parallèles situés le long de l'axe antéro-postérieur desquels partent les trachées ramifiées dont les plus petites, les trachéoles, apportent le dioxygène directement aux cellules.

C. L'appareil reproducteur femelle : Chaque ovaire est constitué d'une vingtaine d'ovarioles produisant les ovocytes. L'ovocyte mature passe dans l'oviducte où il sera fécondé par des spermatozoïdes retenus dans la spermathèque. L'appareil reproducteur mâle : les testis de forme spiralée produisent les spermatozoïdes qui sont déversés dans la vésicule séminale. Les spermatozoïdes associés aux sécrétions des glandes accessoires (contenant notamment le « sex peptide ») transitent par le canal éjaculateur et le bulbe éjaculateur lors de l'accouplement.

(Adapté de Demerec, 1950)

Le système excréteur, constitué des tubules de Malpighi, est couplé au tube digestif : les produits d'excrétion sont déversés dans ce dernier, à la jonction entre les régions moyenne et postérieure de l'intestin (figure 2A).

L'appareil respiratoire est constitué de fins tubes ramifiés, les trachées (figure 2B), apportant directement l'oxygène aux cellules. L'épithélium y est également recouvert d'une intima très fine, favorisant ainsi les échanges gazeux, mais fortifiée dans des zones plus épaisses arrangées en spirales, les ténidies, qui empêchent l'obturation des tubes trachéens.

Dans l'appareil génital, les régions de l'épithélium les plus proches de l'orifice sont également recouvertes d'une intima. C'est notamment le cas du canal éjaculateur, chez le mâle et des oviductes, chez la femelle (figure 2C).

2) Des barrières chimiques et biochimiques

Les épithélia représentent des barrières physiques, mais également des barrières chimiques et biochimiques au développement microbien. Par exemple, l'intestin de la *Drosophile* contient une zone acide, de $\text{pH} < 3$ chez la larve et de $\text{pH} < 4$ chez l'adulte, et, chez la larve, une zone alcaline, de $\text{pH} > 10$ (Shanbhag and Tripathi, 2009). Les nombreuses enzymes digestives qui y sont déversées, telles que les lysozymes, participent probablement à rendre la lumière intestinale hostile à la colonisation microbienne. De plus, les épithélia synthétisent, même en absence d'infection, des molécules microbicides telles que les peptides antimicrobiens (AMP) ou les réactifs oxygénés (voir IV A et B).

Chez les Vertébrés, les épithélia ont également cette double fonction de barrière physique, renforcée par des couches kératinisées pour l'épiderme et recouverte de mucus pour l'intestin, et de barrière chimique et biologique, aussi bien par le pH faible de l'estomac que par la synthèse d'AMP par divers épithélia.

Les micro-organismes ayant franchi ces barrières rejoignent la cavité générale de l'hôte, où ils déclenchent la réponse immunitaire systémique, c'est-à-dire à l'échelle de l'organisme. Celle-ci est décrite ici en suivant une dichotomie historique, séparant d'un côté la réponse cellulaire, médiée par des cellules spécialisées, et de l'autre la réponse humorale, impliquant des molécules solubles dans les "humeurs".

III. La réponse immunitaire systémique

A. L'immunité cellulaire

Elie Metchnikoff a proposé l'existence d'une immunité cellulaire à la fin du XIX^e siècle. Il avait en effet observé qu'après avoir planté une épine végétale dans une larve transparente d'étoile de mer, des cellules habituellement mobiles de la larve s'agrégeaient sur l'épine : ces cellules réagissaient à la présence d'un corps étranger (Tan and Dee, 2009). Il remarqua ensuite qu'après l'introduction de spores de champignons dans des larves de Daphnies, les spores étaient ingérées par ces mêmes cellules mobiles. Il proposa le terme de phagocytose pour désigner ce phénomène qu'il mit en évidence ensuite chez des Insectes et des Mammifères. A l'échelle systémique, l'immunité cellulaire s'est révélée par la suite mettre en jeu divers mécanismes faisant intervenir plusieurs types de cellules circulantes.

La *Drosophile* présente un système circulatoire ouvert, dont le liquide, l'hémolymphe, est mis en mouvement par une pompe, le vaisseau dorsal ou cœur, et irrigue tous les tissus. L'hémolymphe n'intervient pas dans la respiration des cellules, mais dans la réponse immunitaire, à la fois cellulaire et humorale, car elle contient des cellules spécialisées dans l'immunité, les hémocytes, ainsi que de molécules solubles microbicides.

Les hémocytes se développent en particulier aux stades embryonnaire et larvaire, et leur population décroît petit à petit au cours des stades pupal et adulte (Meister, 2004). Certains circulent dans l'hémolymphe tandis que d'autres sont sessiles, c'est-à-dire fixés à la surface de certains tissus. Ils ont une fonction immunitaire de l'embryon à l'adulte, et participent également au développement embryonnaire (Defaye et al., 2009). On en distingue trois classes, de fonctions différentes. Les premiers, les plus nombreux – 90% à 95% des hémocytes – sont les plasmacytes, qui phagocytent les cellules mortes et les micro-organismes de petite taille présents dans l'hémolymphe. Deux études menées récemment sur des *Drosophiles* déplétées en phagocytes ont montré que ceux-ci prévenaient le développement d'infections bactériennes lors de la métamorphose (Charroux and Royet, 2009) et jouaient un rôle prépondérant dans la survie aux infections par certaines bactéries, telles que *Staphylococcus aureus* (Defaye et al., 2009). Ils semblent également prendre part à la communication entre les organes impliqués dans la réponse immunitaire (voir V).

Les cellules à cristaux sont des petits hémocytes contenant des prophénoloxydases, enzymes présentes sous forme de cristaux du fait de leur forte

concentration cytoplasmique (revu dans Lemaitre and Hoffmann, 2007). Ces enzymes, impliquées dans le processus de mélanisation³, sont libérées dans l'hémolymphe par rupture de la cellule suite à son activation.

Enfin, les lamellocytes sont de grandes cellules plates qui participent à l'encapsulation de pathogènes trop grands pour être phagocytés (revu dans Lemaitre and Hoffmann, 2007). Ils ne sont présents que chez la larve et cela dans des situations particulières, notamment en cas d'infestation par des œufs de guêpe parasitoïde. Les lamellocytes se collent au parasite, puis mélanisent, produisant ainsi une capsule noire dans laquelle celui-ci est tué, par des mécanismes partiellement inconnus.

L'immunité cellulaire chez les Mammifères

Chez les Mammifères, l'immunité cellulaire fait également intervenir des cellules circulantes, les leucocytes, qui interviennent dans plusieurs processus dont la phagocytose, un mécanisme conservé chez les animaux. On distingue deux lignages à l'origine des leucocytes, cellules sanguines immunitaires : le lignage lymphoïde, d'où proviennent les lymphocytes T et B et les cellules NK, et le lignage myéloïde (Janeway et al., 2001). Ce dernier produit notamment des cellules phagocytiques, les macrophages et cellules dendritiques, qui, après phagocytose, activent la réponse adaptative par présentation d'antigène aux lymphocytes T. Les autres cellules myéloïdes sont les granulocytes répartis en trois groupes nommés en fonction de leur affinité aux colorants : ce sont les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les granulocytes neutrophiles sont phagocytiques et produisent notamment des AMP stockés dans des vacuoles cytoplasmiques, qui participent à la lyse des micro-organismes lors de la phagocytose. Les éosinophiles tuent les parasites trop gros pour être phagocytés, par dégranulation de molécules toxiques tels que des réactifs oxygénés. Les basophiles sécrètent des molécules intervenant notamment dans le contrôle de la coagulation sanguine et de la vasodilatation. Les cellules de la lignée myéloïde sont également impliquées dans l'activation et l'orientation de la réponse immunitaire par sécrétion de cytokines.

³ La mélanisation est une réaction aboutissant à la formation d'une croûte sombre et hydrophobe, en particulier au niveau d'une blessure (voir II.C.1).

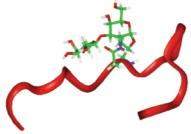
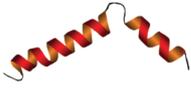
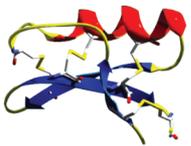
Peptides	Nombre de gènes	Activité principale	Concentration (hémolymphe)	Structure 3D
Diptéricine	2	Bactéries à Gram-négatif	0,5µM	nd
Attacine	4	Bactéries à Gram-négatif	nd	nd
Drosocine	1	Bactéries à Gram-négatif	40µM	
Cécropine	4	Bactéries à Gram-négatif	20µM	
Défensine	1	Bactéries à Gram-positif	1µM	
Drosomycine	7	Champignons	100µM	
Metchnikowine	1	Champignons	10µM	nd

Figure 3: Les sept familles de peptides antimicrobiens de la Drosophile

Pour chaque famille d'AMP, le nombre de gènes, la spécificité d'activité microbicide, la concentration dans l'hémolymphe après induction et la structure tridimensionnelle sont indiqués. nd: non déterminée (Adapté de Lemaitre, 2007)

B. L'immunité humorale

Paul Ehrlich, un contemporain de E. Metchnikoff, a mis en évidence l'existence d'anti-toxines dans le sérum, capables de neutraliser les toxines. C'était le début de l'étude de l'immunité humorale. Chez la Drosophile, H. Boman observa, en 1972, qu'une injection de bactéries induisait la production de défenses antibactériennes protectrices contre une infection subséquente (Boman et al., 1972). Ces substances se sont révélées être des peptides, appelés les peptides antimicrobiens. Partant de ces effecteurs, des études sont progressivement remontées au contrôle de leur expression, puis aux senseurs de l'infection.

1) Les peptides antimicrobiens (AMP)

Les AMP sont synthétisés et sécrétés par le corps gras dans l'hémolymphé en grande quantité en réponse à une infection microbienne. Cette réaction ressemble à certains égards à la synthèse des protéines de phase aigüe, sécrétées rapidement après infection par le foie chez les Mammifères.

Chez la Drosophile, il existe sept familles d'AMP ayant des activités spécifiques contre des classes de microbes variées. Par exemple, la Drosomycine présente une activité spécifiquement antifongique et les Diptéricines contre les bactéries à Gram-négatif. Les AMP sont de petite taille (en général moins de 10kDa, sauf l'Attacine, de 25kDa) et chargés positivement. La structure de certains d'entre eux a été élucidée (Imler and Bulet, 2005) (voir figure 3). Après induction, ils sont présents en concentrations variables dans l'hémolymphé, allant de 0,1 à 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Chez les Vertébrés, les AMP ne sont pas sécrétés de façon systémique, mais uniquement à l'échelle locale (voir IV). Cela est probablement lié à la taille de ces animaux, impliquant un volume plus important de leur cavité générale, ne permettant pas d'atteindre rapidement des concentrations adaptées à l'activité des AMP.

2) Une induction contrôlée par les voies Toll et Imd

Dans les quelques heures suivant une infection systémique, les transcrits des AMP passent d'une concentration initiale à peine détectable dans les cellules du corps gras à des niveaux très élevés, l'induction étant de l'ordre de 100 à 1000 fois pour le gène de la *Diptéricine*. Les deux voies moléculaires d'induction de cette transcription ont été découvertes dans les années 1990 : les voies Toll et

Imd, toutes deux impliquant l'activation de facteurs de transcription de la famille NF- κ B. Chacune de ces voies est induite préférentiellement en réponse à une infection par un type de microbes, et induit certains AMP ayant une activité adaptée : ainsi, la voie Toll répond aux infections par des champignons, et induit en particulier la production de *Drosomycine*, à activité antifongique (Lemaitre et al., 1996). La découverte de l'implication de la voie Toll dans l'immunité a notamment eu un grand impact, puisqu'elle a été un indice déterminant vers la découverte des fonctions des récepteurs Toll-like (TLR) des Vertébrés.

a) La voie Toll répond aux infections fongiques ou de bactéries à Gram-positif

La voie Toll a d'abord été caractérisée pour son rôle dans le développement embryonnaire de la Drosophile (Belvin and Anderson, 1996). Elle intervient en effet dans l'établissement de l'axe dorso-ventral de l'embryon. Comme elle implique des facteurs maternels, il est possible d'obtenir des mutants homozygotes pour les gènes de la voie Toll, quoique les femelles soient stériles. Chez ces mutants, l'induction de la Drosomycine après infection bactérienne ou fongique est beaucoup plus faible que chez le sauvage, et les mutants succombent à une infection fongique ou par des coques à Gram-positif (Lemaitre et al., 1996).

Les étapes de signalisation mises en jeu dans la voie Toll sont actuellement bien caractérisées (Figure 4) : en liant le ligand Spätzle, le récepteur Toll se dimérise, ce qui provoque le recrutement des adaptateurs intracellulaires MyD88 et Tube et de la kinase Pelle (Belvin and Anderson, 1996; Tauszig-Delamasure et al., 2002). Celle-ci, par un mécanisme non élucidé, cible l'inhibiteur Cactus vers le protéasome après phosphorylation, ce qui provoque la libération des facteurs de transcription Dif et Dorsal, qui entrent dans le noyau et induisent leurs gènes cibles par fixation sur les motifs κ B de leurs promoteurs.

b) La voie Imd répond aux infections par des bactéries à Gram-négatif

La voie Imd, pour Immune deficiency, est activée par reconnaissance de peptidoglycane par le récepteur PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein)-LC (Figure 4) (Gottar et al., 2002; Lemaitre et al., 1995; Leulier et al., 2003). Comme dans le cas de la voie Toll, le récepteur se dimérise alors, liant l'adaptateur Imd, point de départ de deux voies de signalisation aboutissant à la phosphorylation et au clivage du facteur de transcription Relish entre ses domaines inhibiteur et transactivateur (Hedengren et al., 1999). Ce dernier entre alors dans le noyau, activant ses gènes cibles par liaison spécifique aux domaines κ B de leurs promoteurs.

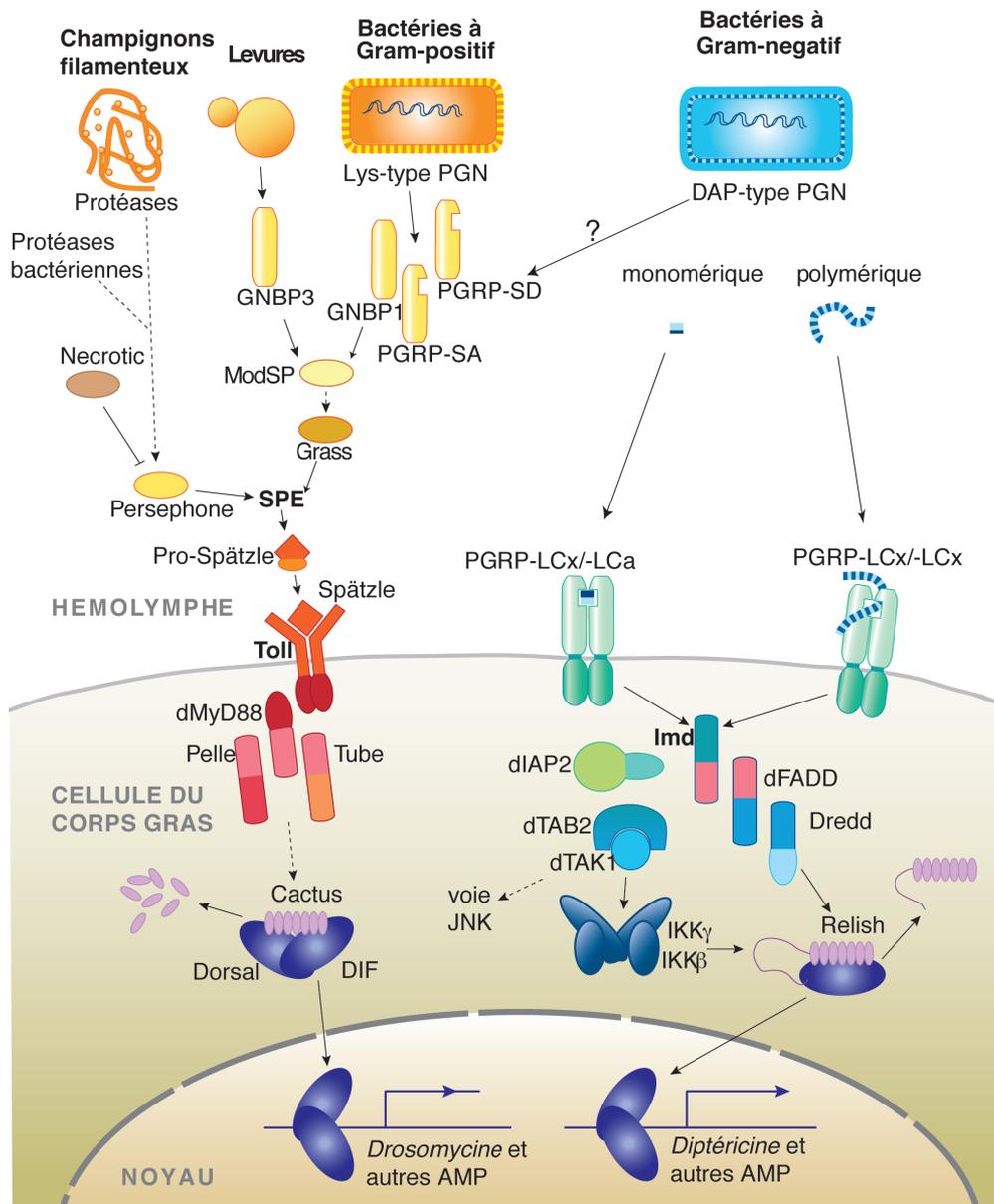


Figure 4 : Activation de l'expression des gènes encodant les AMP par les voies Toll et Imd

La voie Toll est induite par deux voies indépendantes, principalement en réponse aux infections fongiques ou par des bactéries à Gram-positif. D'une part, le PGN de type Lys est reconnu par PGRP-SA, qui induit l'activation protéolytique de ModSP, puis de Grass. D'autre part, l'activité hydrolytique de protéases à sérine de champignons ou de bactéries provoque l'activation par clivage de Persephone. Grass et Persephone induisent le clivage de SPE (Spätzle Processing Enzyme), qui active la cytokine Spätzle, alors reconnue par le récepteur Toll. L'activation de Toll provoque le recrutement des adaptateurs dMyd88, Tube et Pelle, ce qui aboutit à la phosphorylation et à la dégradation de Cactus par le protéasome. Les facteurs de transcription Dorsal et DIF entrent alors dans le noyau et activent l'expression des gènes de certains AMP, en particulier la Drosomycine, utilisée comme témoin d'activation de la voie Toll. La voie Imd est activée principalement après infection par des bactéries à Gram-négatif par reconnaissance de PGN de type DAP polymérique par PGRP-LCx et monomérique par PGRP-LCx associé à PGRP-LCa. PGRP-LC activé recrute l'adaptateur Imd qui active dTak1 par le biais de dIAP2, ce qui aboutit à la phosphorylation de Relish. La phosphorylation de Relish et son clivage entre le domaine facteur de transcription et le domaine inhibiteur : le facteur de transcription entre alors dans le noyau et active les gènes de certains AMP, en particulier de la Diptéricine, utilisée comme témoin d'induction de la voie Imd. Pointillés: mécanisme indirect ou potentiellement indirect (Modifié de Lemaitre, 2007)

Si la réponse à chaque infection induit des réponses différentes, les voies Toll et Imd ne sont cependant pas totalement exclusives l'une de l'autre. En effet, la plupart des gènes codant des AMP sont régulés à la fois par Toll et par Imd selon un dosage particulier. A titre d'exemple, l'induction de la *Drosomycine* après infection fongique est abolie chez un mutant *Spätzle*, de la voie Toll, mais également affectée chez un mutant *Relish*, de la voie Imd (De Gregorio et al., 2002). D'autres voies de transduction interviennent également dans la réponse à l'infection systémique. Ainsi, la voie JNK est induite par l'un des composants de la voie Imd, Tak1 (Silverman et al., 2003). Cette voie induit notamment l'expression de gènes liés au remodelage du cytosquelette. Il a également été proposé qu'elle serait nécessaire à l'expression d'AMP par le corps gras (Delaney et al., 2006).

3) L'initiation des voies Toll et Imd

La cytokine Spätzle, qui lie le récepteur Toll, est activée par clivage de son précurseur, au terme d'une cascade d'activations protéolytiques impliquant des protéases à sérine (Figure 4). Celle-ci peut être initiée par reconnaissance de MAMP ou de DAMP. D'une part, des composants de la paroi microbienne, les β -glucanes fongiques et le peptidoglycane bactérien, sont reconnus par des récepteurs solubles dans l'hémolymphe, respectivement GGBP3 et le complexe PGRP-SA/GGBP1 (Gram-negative binding protein⁴) (Gobert et al., 2003; Gottar et al., 2006). Cela provoquerait l'autoactivation de la protéase à sérine ModSP, laquelle initierait une cascade protéolytique conduisant au clivage de pro-Spätzle en Spätzle (Buchon et al., 2009c). D'autre part, les mécanismes d'invasion de certains champignons, comme *Beauveria bassiana*, et de certaines bactéries passent par la sécrétion de protéases dans le milieu, qui peuvent activer la voie Toll en clivant la protéase à sérine Perséphone (El Chamy et al., 2008; Ligoxygakis et al., 2002a). Dans ce cas, les facteurs de virulence sont détectés par le biais de leur activité sur l'hôte. Ce type de reconnaissance a été initialement décrit chez les plantes, où la réponse est élicitée, entre autres, par les fragments de paroi cellulaire dégradée (Hematy et al., 2009).

⁴ La famille des GGBP a été nommée par erreur protéines liant les bactéries Gram-négatif. Cependant, ces protéines sont impliquées dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif ou des champignons.

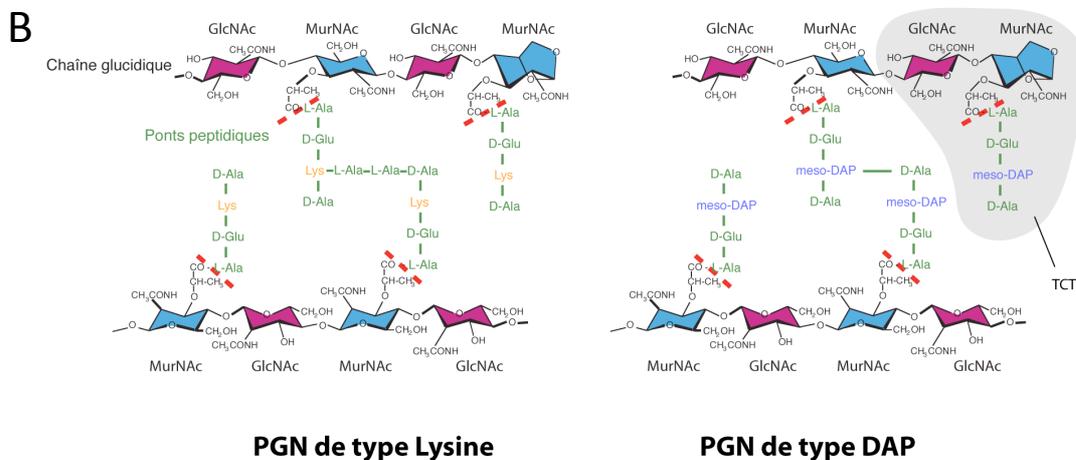
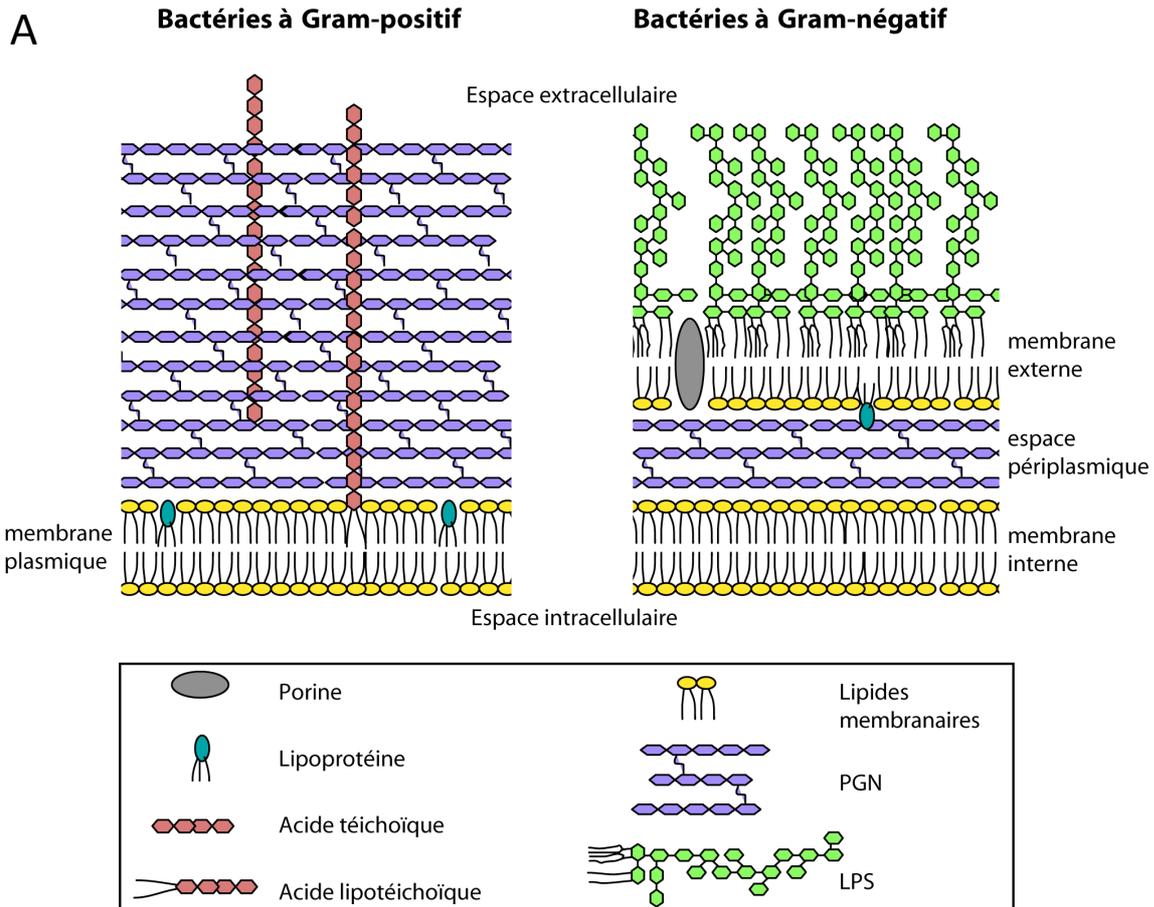


Figure 5: Structures des enveloppes bactériennes

A. L'enveloppe des bactéries à Gram-positif est composée d'une membrane plasmique constituée d'une bicouche de phospholipides associés à des lipoprotéines, recouverte d'une épaisse couche de PGN, contenant des acides téichoïques, ancrés dans le PGN et lipotéichoïques, ancrés dans la membrane. L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif est constituée de deux membranes, interne et externe, renfermant une fine couche de PGN. La membrane externe est constituée d'une couche de phospholipides et d'une couche de LPS (lipopolysaccharide). (adapté de la thèse de A. Zaidman-Rémy)

B. Les PGN de type Lysine et de type DAP sont présents respectivement dans la paroi des coques à Gram-positif et dans la paroi des Bactéries à Gram-négatif et des bacilles à Gram-positif. Il est constitué de chaînes glucidiques de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc), reliées par des ponts peptidiques contenant une Lysine ou un acide méso-diaminopimélique (méso-DAP) en 3^e position. La toxine trachéenne (TCT) est un monomère de PGN de type DAP contenant une boucle 1,6-anhydro au niveau de MurNAc (Adapté de Broderick, 2009)

La voie Imd est, elle, directement induite par reconnaissance de peptidoglycane, en particulier par le récepteur transmembranaire PGRP-LC.

4) Le peptidoglycane bactérien et sa reconnaissance

a) Structure du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un composant essentiel des parois bactériennes (Figure 5) et, chez la Drosophile, un des principaux MAMP induisant la réponse immunitaire. Il s'agit d'un polymère constitué de chaînes glucidiques composées d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) et de N-acétylglucosamine (GlcNAc) disposés en alternance et reliées entre elles par de courts peptides (revu dans Cloud-Hansen et al., 2006). Le monomère de peptidoglycane, appelé muropeptide, est constitué d'un couple GlcNAc-MurNAc associé à un tétrapeptide : le GlcNAc-MurNAc-Ala-Glu-Acide diaminé-Ala. La séquence du tétrapeptide diffère au niveau du troisième acide aminé : il s'agit d'une Lysine pour les coques à Gram-positif, et d'un acide méso-diaminopimélique (DAP) pour les Bactéries à Gram-négatif et les bacilles à Gram-positif. On parlera respectivement de peptidoglycane de type Lysine ou de type DAP.

Le peptidoglycane peut être libéré lors de lyses bactériennes, mais également pendant la croissance et la division bactérienne (revu dans Cloud-Hansen et al., 2006). Dans ce second cas, il est libéré sous forme de monomères. En effet, la croissance de la paroi bactérienne implique un remodelage du peptidoglycane, dont une partie est dégradée en monomères qui sont alors recyclés. En particulier, la cytotoxine trachéenne ou TCT est un monomère de peptidoglycane de type DAP dont le MurNAc porte une boucle 1,6-anhydro. Elle est impliquée dans le recyclage et est sécrétée par certaines bactéries. Elle constitue le plus petit fragment de peptidoglycane reconnu par le système immunitaire de la Drosophile (Stenbak et al., 2004).

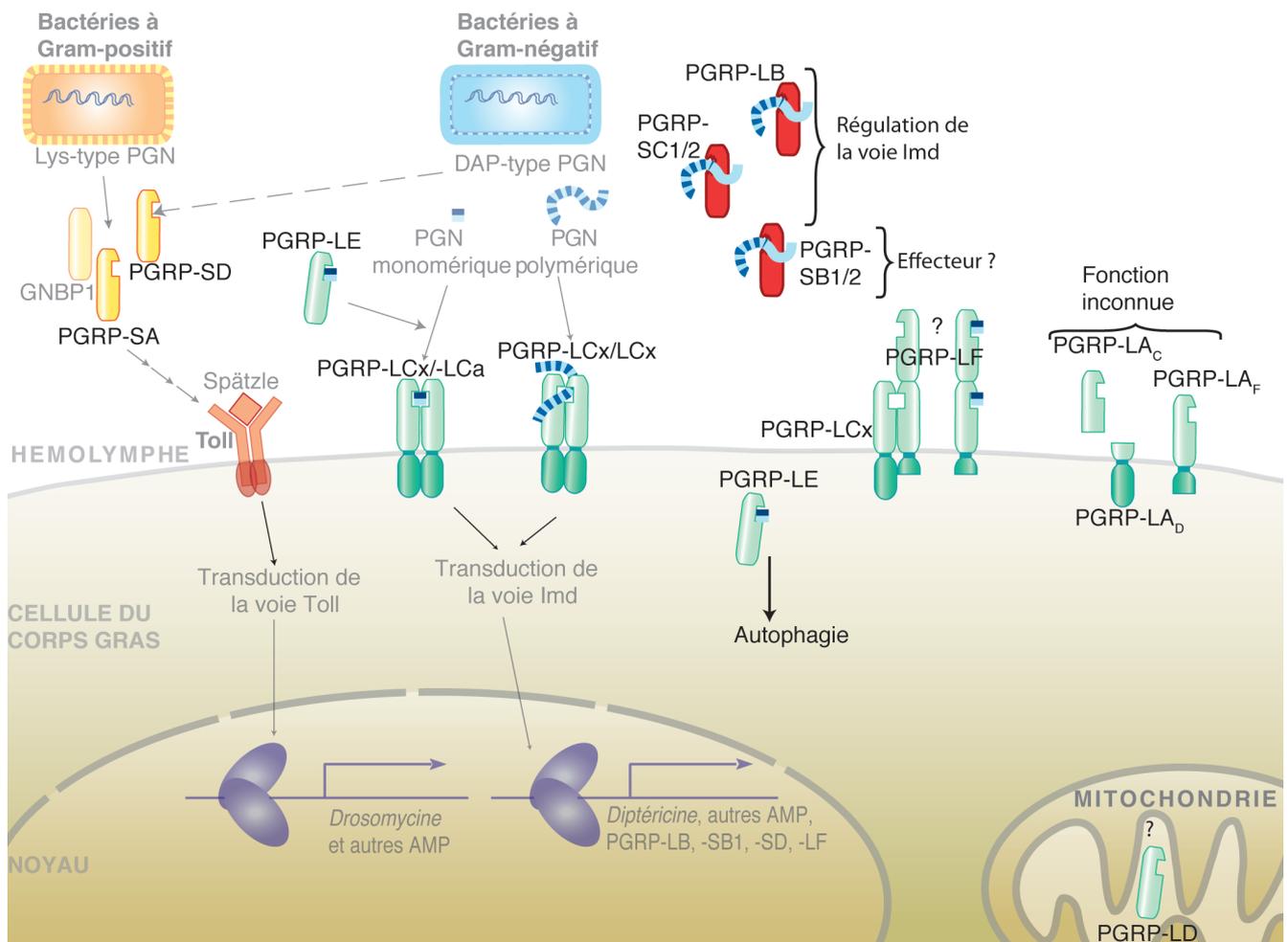


Figure 6: Fonctions des PGRP dans la réponse immunitaire de la *Drosophile*

PGRP-SA et SD sont des récepteurs induisant la voie Toll respectivement après reconnaissance de PGN de type Lys et DAP. PGRP-LC et LE induisent la voie Imd, principalement après reconnaissance de PGN de type DAP. PGRP-LE intracellulaire est également impliqué dans l'induction de l'autophagie. PGRP-SC1A/1B/2 et PGRP-LB sont des régulateurs négatifs de la réponse par dégradation du PGN en fragments non immunogènes. La fonction de PGRP-SB1/2 n'est pas totalement caractérisée, mais il a été proposé que PGRP-SB1 soit un effecteur microbicide. PGRP-LF régule négativement la voie Imd, par piégeage du PGN ou par séquestration de PGRP-LC. Les fonctions de PGRP-LD et de PGRP-LA sont inconnues, mais PGRP-LD serait localisé dans la mitochondrie.

b) Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP)

Certaines protéines de reconnaissance du peptidoglycane, ou PGRP, reconnaissent spécifiquement le peptidoglycane de type Lys ou le peptidoglycane de type DAP et induisent respectivement les voies Toll et Imd (revu dans (Charroux et al., 2009)). Ces protéines contiennent un domaine PGRP conservé, constitué de 160 acides aminés environ, présentant des similarités avec le lysozyme du bactériophage T7, une amidase dégradant le peptidoglycane au niveau de la liaison MurNAc-tétrapeptide. Il existe 13 gènes codant 17 PGRP dans le génome de la Drosophile, nommés initialement en fonction de leur longueur : les PGRP-L, longs, et les PGRP-S, courts (Werner et al., 2000). Une caractéristique plus fonctionnelle est actuellement utilisée pour les classer : certains ont une activité enzymatique sur le peptidoglycane, clivant la liaison MurNAc-tétrapeptide (Mellroth et al., 2003; Mellroth and Steiner, 2006; Zaidman-Remy et al., 2006), et d'autres lient le peptidoglycane mais ne le dégradent pas.

Parmi ces derniers, certains ont été caractérisés comme des récepteurs de peptidoglycane induisant les voies Toll et Imd (Figure 6). PGRP-SA est un récepteur extracellulaire présent dans l'hémolymphe, liant le peptidoglycane de type Lys en se dimérisant avec GGBP1 (Gobert et al., 2003; Michel et al., 2001). PGRP-SD intervient également dans l'induction de la voie Toll, mais sa fonction exacte n'a pas été clairement établie. Il a été proposé comme récepteur impliqué dans l'induction de la voie Toll en redondance partielle avec PGRP-SA/GGBP1, après infection par certaines bactéries à Gram-positif, en particulier *S. aureus* (Bischoff et al., 2004). Plus récemment, une étude associant biologie structurale et expériences *in vivo* a révélé que PGRP-SD ne lie pas le peptidoglycane de *S. aureus*, mais plutôt le peptidoglycane de type DAP. Il semble intervenir dans l'induction de la voie Toll par le peptidoglycane de type DAP des bactéries *E. coli* et *B. subtilis* respectivement à Gram-négatif et à Gram-positif (Leone et al., 2008).

PGRP-LC est un récepteur membranaire, ayant plusieurs isoformes aux fonctions diverses. En particulier, une étude en culture de cellules suggère que PGRP-LC_X sous forme d'homodimère reconnaît le peptidoglycane de type DAP polymérique tandis qu'un hétérodimère composé de PGRP-LC_X et PGRP-LC_A reconnaît la TCT, monomérique (Kaneko et al., 2004). La fonction de l'isoforme PGRP-LC_Y reste inconnue. PGRP-LF est une protéine transmembranaire possédant deux domaines PGRPs qui agit en tant que

régulateur négatif de PGRP-LC, suivant un mécanisme non élucidé : il pourrait inhiber directement le récepteur ou piéger le peptidoglycane (Maillet et al., 2008). PGRP-LE n'a pas de domaine transmembranaire. Selon sa localisation, il semble avoir deux fonctions distinctes : extracellulaire, il se polymériserait en liant la TCT et induirait alors PGRP-LC ; intracellulaire, il agirait comme senseur de peptidoglycane dans le cytosol en présence de bactéries intracellulaires telles que *Listeria monocytogenes*, et activerait alors la voie Imd ainsi que l'autophagie (Kaneko et al., 2006; Yano et al., 2008). Enfin, la fonction de certains PGRP n'est pas encore élucidée. C'est le cas de PGRP-LA et de PGRP-LD.

Peptidoglycane et PGRP chez les Vertébrés

Si la reconnaissance du peptidoglycane par les PGRP a un rôle majeur dans l'induction de la réponse immunitaire chez la Drosophile, il n'en est pas de même chez les Vertébrés. En effet, chez les Mammifères, il semble que l'induction d'une réponse au peptidoglycane soit assurée de façon extracellulaire par les récepteurs CD14 (cluster of differentiation) et TLR2 et de façon intracellulaire par NOD1 et NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerisation Domain) (Royet and Dziarski, 2007). En particulier, NOD1 reconnaît des fragments de peptidoglycane dont le motif minimal est le tripeptide de type DAP (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a), des bactéries à Gram-négatif, alors que NOD2 peut lier des muramyl-dipeptides, constituants des peptidoglycane de types Lys et DAP (Girardin et al., 2003b; Inohara et al., 2003). La reconnaissance du peptidoglycane a un effet plus local que chez la Drosophile : elle aboutit à l'induction d'une inflammation locale, et NOD2 induit également l'autophagie (Cooney et al., 2010).

Quant aux PGRP, il en existe quatre chez les Mammifères, notés PGLYRP 1 à 4 (Royet and Dziarski, 2007). L'un d'entre eux, PGLYRP2, a une fonction amidase, tandis que les trois autres ont un effet microbicide, mais ne sont pas catalytiques. Ces derniers appartiennent donc plutôt aux effecteurs de la réponse, tandis qu'une étude récente propose que PGLYRP2 agisse comme une cytokine proinflammatoire, sous le contrôle transcriptionnel d'une voie induite par NOD2 (Saha et al., 2009). Chez le poisson-zèbre, les PGRP étudiés jusqu'à présent sont des effecteurs dont l'effet microbicide dépend de l'activité amidase (Li et al., 2007).

La présence de micro-organismes dans l'hémolymphe induit une réponse cellulaire, notamment par phagocytose, et une réponse humorale, par sécrétion

d'AMP. Certains mécanismes, la mélanisation et la coagulation, font intervenir des molécules solubles dans l'hémolymphe et des hémocytes et sont donc à l'interface entre les réponses humorale et cellulaire.

C. Réponses intégrant des composantes humorales et cellulaires

1) La mélanisation

La mélanisation est une réaction aboutissant à la synthèse et au dépôt de mélanine, une substance noire insoluble. Elle est activée dans l'hémolymphe après une blessure ou en présence de corps étrangers, et dans les lamellocytes lors de l'encapsulation. Elle implique, comme la voie Toll, une réaction en chaîne de protéases à sérine terminant par l'activation d'une enzyme, la prophénoloxydase (Tang, 2009). Celle-ci est libérée dans l'hémolymphe par rupture des cellules à cristaux activées et catalyse la production des précurseurs de mélanine. Cette molécule insoluble participe à la formation d'une croûte obstruant la blessure. Une autre fonction de la mélanisation pourrait résider en la toxicité de ses intermédiaires réactionnels, potentiellement antimicrobiens.

La mélanine est une substance présente dans tout le vivant, exerçant des fonctions diverses, notamment de pigment photoprotecteur. Cependant, la mélanisation en tant que mécanisme de réaction immunitaire est spécifique aux Arthropodes.

2) La coagulation

La croûte formée par coagulation au niveau de la blessure est constituée d'un réseau de fibres protéiques dans lequel des hémocytes sont enchassés (revu dans Lemaitre and Hoffmann, 2007). Les fibres contiennent notamment une protéine synthétisée par les plasmacytes, l'hémolécine, et leur pontage fait intervenir des protéines présentes dans l'hémolymphe, en particulier Fondue et la transglutaminase (Scherfer et al., 2006). Des cellules à cristaux situées dans cette structure sont à l'origine de mélanisation, et la prophénoloxydase qu'elles libèrent interviendrait également dans la consolidation du caillot.

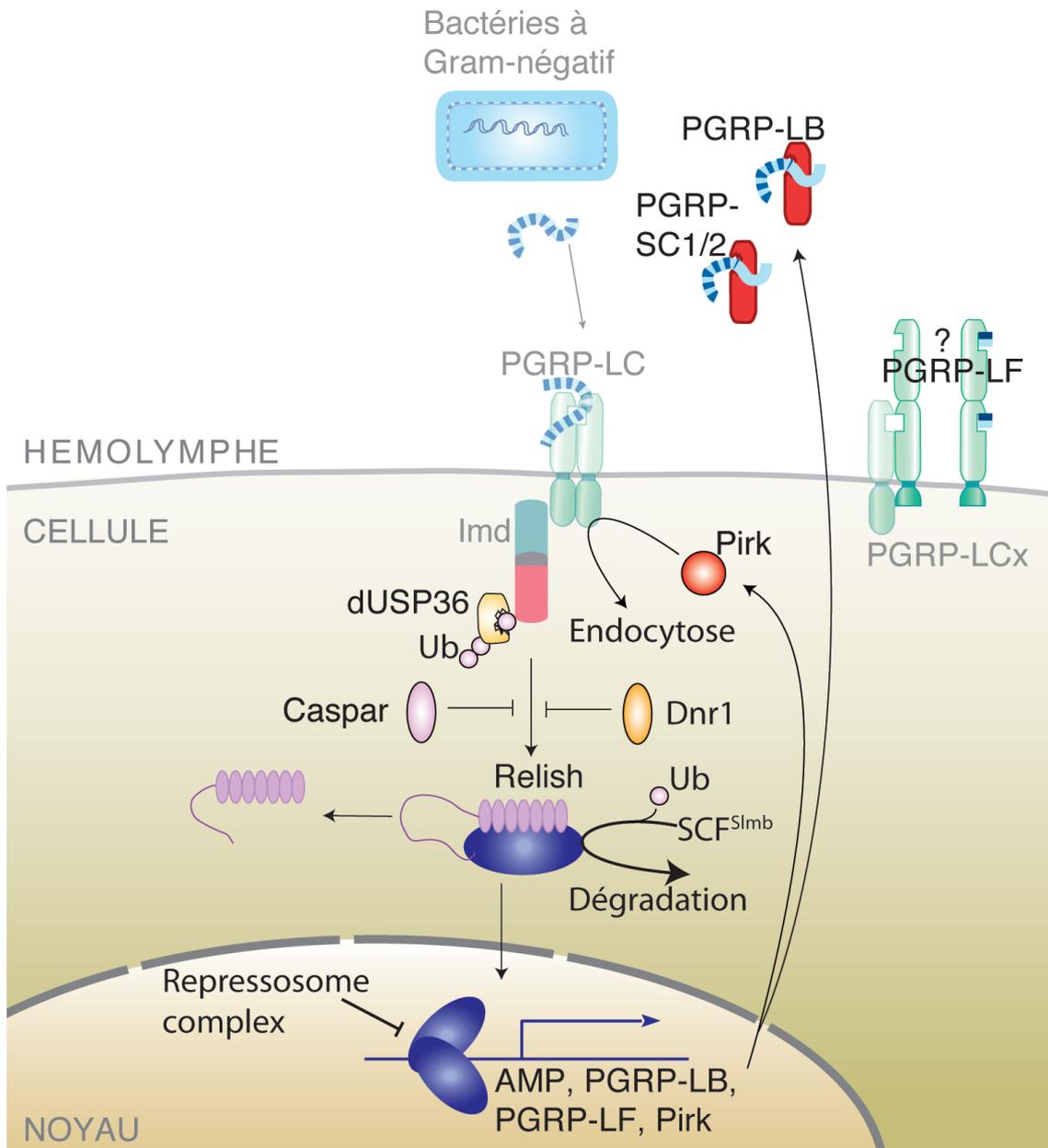


Figure 7: Régulation négative de la voie Imd

Plusieurs étapes de l'activation de la voie Imd présentent des régulateurs négatifs. Le PGN est dégradé par les PGN catalytiques (PGRP-LB et PGRP-SC). PGRP-LC est séquestré dans des vacuoles d'endocytose par Pirk. Imd est désactivé par dUSP36 (*drosophila* Ubiquitin Specific Protéase). Caspar et Dnr1 (Defense repressor 1) bloquent l'infection de Relish par Dredd. Relish est ubiquitinylé par SCF^{SImb}, ce qui provoque sa dégradation par le protéasome. Enfin, le "repressosome complex" inhibe la transcription des gènes cibles par Relish dans le noyau.

La coagulation limite les pertes d'hémolymphe dues à la blessure et piège également les micro-organismes dans une région limitée. En effet, il a été mis en évidence récemment que la transglutaminase était active sur les surfaces de micro-organismes, et indispensable à leur séquestration dans cet agglomérat (Wang et al., 2010). La même étude rapporte que son homologue humain, le facteur XIII, a le même effet dans le caillot, en piégeant à la fois les bactéries *S. aureus* et *E. coli*, respectivement à Gram-positif et à Gram-négatif.

La présence de micro-organismes dans l'hémolymphe entraîne donc des réponses diverses dans la cavité générale et les cellules avoisinantes, en particulier celles du corps gras. Une réponse immunitaire est énergétiquement coûteuse et peut, de plus, générer des composés toxiques aux cellules de l'organisme. Elle peut donc être néfaste si elle est déclenchée ou maintenue de façon inopportune. Chez la *Drosophile*, il a été mis en évidence que la réponse systémique était hautement régulée par des boucles de rétrocontrôle, et ce à plusieurs niveaux, jouant sur la détection de MAMP par les PRR ou sur la transduction du signal qui en résulte.

D. Le rétrocontrôle négatif de la réponse

a) Au niveau de la détection des MAMP

Les boucles de rétrocontrôle impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire jouent en premier lieu sur la disponibilité des MAMP et des PRR, et donc sur l'initiation de la réponse. Ainsi, au sein de la voie Imd, des études combinant biochimie, génétique inverse et biologie cellulaire ont mené à l'identification de régulateurs intervenant sur la disponibilité du peptidoglycane et de PGRP-LC.

D'une part, les PGRP catalytiques dégradent le peptidoglycane en rompant les liaisons entre la chaîne osidique et les peptides, produisant ainsi des fragments non reconnus par PGRP-LC et n'induisant aucune réponse. Il a donc été proposé qu'ils agissent comme régulateurs négatifs de la réponse au peptidoglycane (Mellroth et al., 2003). Cette hypothèse a notamment été validée dans le cas de PGRP-LB (Figure 7) (Zaidman-Remy et al., 2006; Welchman, en préparation). En effet, l'inactivation de PGRP-LB par interférence ARN ou délétion du gène conduit à une réponse Imd accrue et prolongée après infection systémique par *Ecc15*. Cette protéine, produite par le corps gras sous le contrôle

de la voie Imd, appartient donc à une boucle de rétroaction négative contrôlant cette voie par désactivation de son éliciteur. PGRP-SC1 et 2, également catalytiques, ont fait l'objet d'études contradictoires, l'une impliquant PGRP-SC1a dans l'induction de la voie Toll et la phagocytose de bactéries à Gram-positif, l'autre PGRP-SC1/2 dans la régulation négative de la voie Imd (Bischoff et al., 2006; Garver et al., 2006).

D'autre part, une perte de fonction dans le gène *pirk/rudra/pims* est également à l'origine d'une hyperactivation de la réponse Imd à une infection systémique (Aggarwal et al., 2008; Kleino et al., 2008; Lhocine et al., 2008). En culture de cellules, une coexpression de *PGRP-LC* et *pirk* mène à la relocalisation de PGRP-LC de la membrane plasmique vers des vésicules cytoplasmiques (Lhocine et al., 2008). Ainsi, *pirk* semble réguler la voie Imd en jouant sur la disponibilité de son PRR.

b) Au niveau de la transduction du signal

La réponse est également régulée en aval de l'initiation du signal par le PRR (Figure 7). Un crible réalisé pour identifier des suppresseurs de la réponse immunitaire a mené à la caractérisation de Caspar, un régulateur négatif de la voie Imd agissant en aval d'Imd et inhibant la relocalisation nucléaire du facteur de transcription Relish (Kim et al., 2006).

La protéase de l'ubiquitine dUSP36 (*drosophila* Ubiquitin Specific Protease) a été récemment identifiée comme un régulateur de l'activité de la protéine Imd, dans une étude génétique *in vivo* et en culture de cellules (Thevenon et al., 2009). En effet, l'inactivation de *dUSP36* par interférence ARN provoque l'induction d'une réponse immunitaire en absence d'infection. De plus, sa surexpression réduit l'intensité de la réponse à une infection systémique, et cet effet est dépendant de l'activité catalytique de dUSP36. Des expériences réalisées en culture de cellules mettent en évidence que dUSP36 joue sur la balance entre les ubiquitinations de types K63 et K48, provoquant respectivement l'activation et la dégradation d'Imd, et favorise cette dernière.

Les cascades de protéases à sérine, à l'origine de l'induction de la voie Toll et de la mélanisation, sont également hautement régulées par des Serpin (Serine-protease inhibitors). Le génome de la Drosophile contient 29 gènes encodant ces inhibiteurs, dont plusieurs ont été caractérisés dans la régulation de la voie Toll et de la cascade de mélanisation (Levashina et al., 1999; Ligoxygakis et al., 2002b; Scherfer et al., 2008). Notamment, Necrotic régule la voie Toll en amont de Persephone et Serpin27A la mélanisation dans l'hémolymphe.

c) *Au niveau de la stabilité des messagers*

Un dernier niveau de régulation de la réponse peut résider dans la stabilité de ses effecteurs, ainsi que de leurs transcrits. Les AMP sont des molécules relativement stables, encore détectables dans l'hémolymphe une semaine après infection systémique. Au contraire, certains transcrits encodant des AMP sont très rapidement dégradés. En particulier, deux études récentes en culture de cellules ont montré que la labilité de l'ARNm de *CecropinA1* implique la reconnaissance des séquences riches en AU présentes dans la région 3' non codante de l'ARN (Lauwers et al., 2009; Wei et al., 2009).

La présence de microbes dans l'hémolymphe induit une réponse systémique, dont une clé réside dans la production hautement régulée d'AMP par le corps gras. Des réponses plus locales ont également été mises en évidence, à la fois au sein de la cellule lors d'une infection par un pathogène intracellulaire, et au niveau de l'épithélium en cas d'accumulation de microbes à son contact.

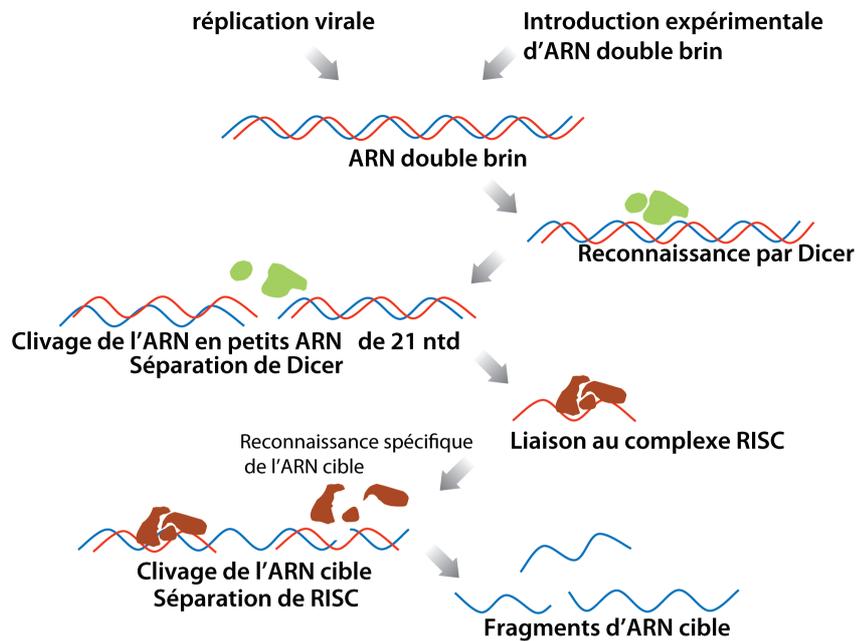
IV. La réponse immunitaire locale

A. Une réponse autonome par la cellule infectée

1) La destruction de tout ou partie de la cellule infectée

Lors d'une infection intracellulaire, plusieurs mécanismes participent à l'élimination de l'agent pathogène directement au niveau de la cellule infectée, ce qui a pour effet de limiter la propagation de l'infection. En particulier, la cellule infectée répond elle-même de façon indépendante à l'infection, notamment par dégradation d'une région infectée de la cellule par autophagie, ou par mort cellulaire. L'autophagie est la digestion par la cellule de certains de ses composants : ceux-ci sont d'abord séquestrés dans des vacuoles d'autophagie, qui fusionnent ensuite avec des lysosomes. Une étude menée sur le récepteur PGRP-LE a mis en évidence que sa présence dans les hémocytes était essentielle à la survie des mouches après infection par la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* (Yano et al., 2008). L'absence de PGRP-LE provoque notamment une multiplication des bactéries dans les hémocytes et elle peut être complémentée par induction de l'autophagie. PGRP-LE apparaît donc comme essentiel dans l'induction de l'autophagie au sein de la cellule infectée.

A MÉCANISME DE L'INTERFÉRENCE ARN



B UTILISATION DE L'INTERFÉRENCE ARN CHEZ LA DROSOPHILE

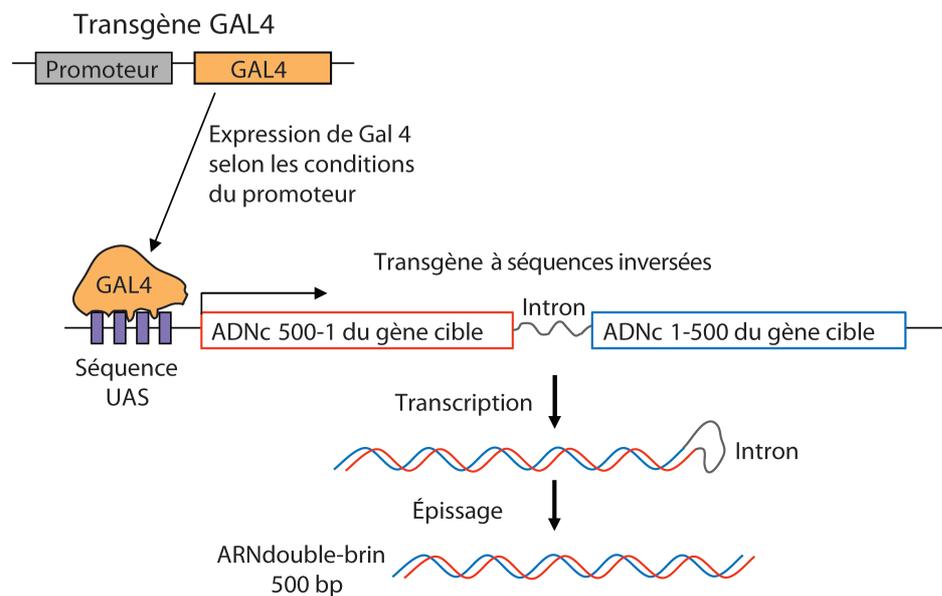


Figure 8: L'interférence ARN

A. L'interférence ARN est déclenchée par reconnaissance d'ARN double brin par Dicer. Celui-ci clive alors l'ARN en fragments de 21 nucléotides qui se lient alors au complexe RISC. Les ARN de séquence complémentaire à ces petits ARN sont alors dégradés par le complexe RISC. (modifié de Belles, 2010)

B. L'interférence ARN est utilisée chez la Drosophile pour inactiver l'expression d'un gène d'intérêt. Pour cela, le système UAS-Gal4 est utilisé pour l'expression d'une séquence incluant une partie de la séquence de l'ARN du gène, ainsi que sa séquence homologue. Après expression, l'ARN du transgène prend alors la forme d'un double brin, qui sera dégradé dans la cellule.

La cellule infectée peut également mourir par apoptose, limitant la propagation de l'infection. Cela n'a pas été directement mis en évidence chez la *Drosophile*, mais il a été observé qu'une surexpression de la voie Imd menait à l'induction de l'apoptose dans le corps gras (Georgel et al., 2001). Cette mort cellulaire serait également induite dans les disques imaginaux d'ailes chez des mutants PGRP-LF, du fait de la dérégulation de la voie JNK en aval de la voie Imd (Maillet et al., 2008).

Une réaction très similaire est également bien caractérisée chez les Plantes. Cette réaction, dite d'hypersensibilité, fait intervenir la mort de la cellule infectée et l'envoi aux cellules voisines d'un signal d'alarme, induisant éventuellement leur mort. L'autophagie semble impliquée dans cette réaction, et pourrait protéger les cellules avoisinant la cellule infectée contre les signaux induisant leur mort (Hayward et al., 2009). Un autre mécanisme intracellulaire de restriction de l'infection est l'interférence ARN, induite chez la *Drosophile* par des infections virales.

2) L'interférence ARN

L'interférence ARN est un mécanisme impliqué dans l'immunité anti-virale, inductible dans la plupart des cellules. Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent se répliquer qu'à l'intérieur de la cellule hôte. Après pénétration dans la cellule, la première étape du cycle d'un virus à ARN est la réplication de son génome, aboutissant à la formation d'un ARN double brin. Cette structure est reconnue par la cellule, qui induit alors un mécanisme d'interférence (Figure 8) : l'ARN double brin est d'abord clivé en fragments d'une vingtaine de nucléotides, et l'interférence est amplifiée par hybridation de ces petits ARN aux ARN viraux présents dans la cellule, qui seront alors des cibles de dégradation (Belles, 2010). Ce phénomène d'interférence est utilisé en génétique pour empêcher l'expression de gènes d'intérêt.

L'interférence ARN est un mécanisme très conservé, existant chez les plantes et les animaux, mais présentant des modalités diverses. En plus de son activité anti-virale, elle limite la propagation d'éléments exogènes au sein du génome. Ces deux fonctions ne semblent cependant pas exercées chez toutes les espèces. En particulier, l'activité anti-virale de l'interférence ARN chez les Mammifères est encore en question (Sidahmed and Wilkie, 2010). De plus, en fonction des organismes, les petits ARN seraient excrétés par les cellules,

A

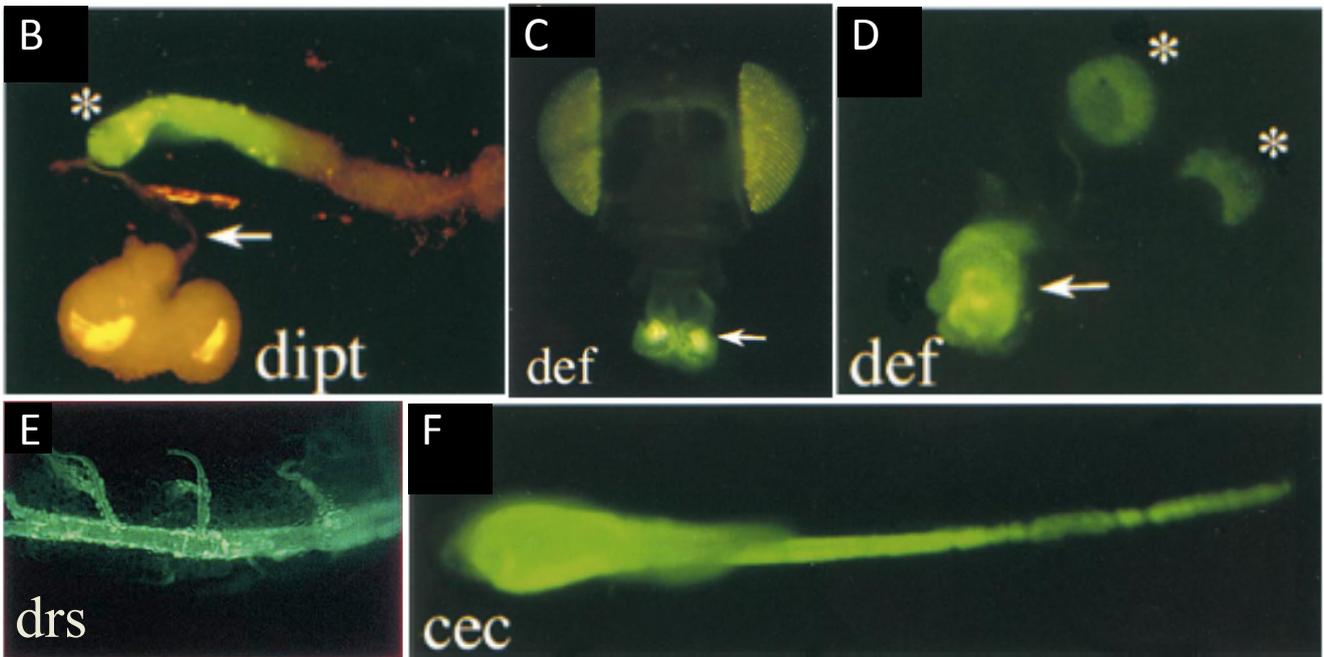
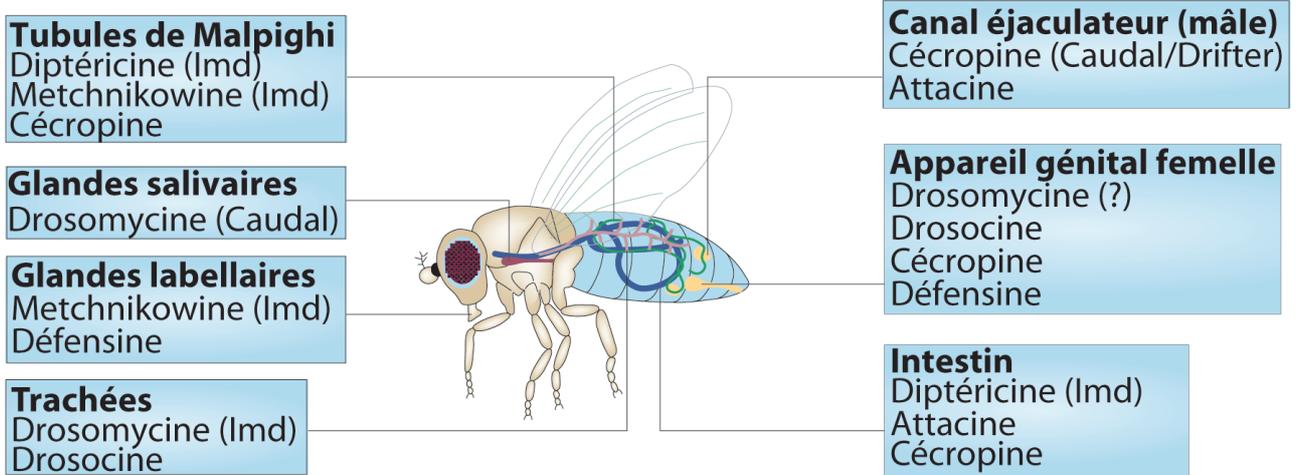


Figure 9: L'expression épithéliale des peptides antimicrobiens

A. Synthèse sur la production d'AMP par les épithélia. B-F. Observations de l'expression des gènes encodant les AMP par utilisation de rapporteurs encodant la GFP sous le contrôle des promoteurs dipt: Diptéricine; def: Défensine; drs: Drosomycine; cec: Cécropine. Dans B et D, les astérisques marquent respectivement le cardia et les spermathèques. Dans B, C et D, les flèches marquent respectivement l'œsophage (non fluorescent), les glandes labellaires et le réceptacle séminal (A: adapté de Ferrandon, 2007, B-D,F: Tzou, 2000; E: Ferrandon, 1998)

aboutissant à un ciblage généralisé dans l'organisme, comme chez le Nématode *Caenorhabditis elegans*. Chez la Drosophile, au contraire, l'interférence ARN est autonome cellulaire, ce qui permet d'interférer expérimentalement avec l'expression d'un gène dans un tissu spécifique. Cette restriction cellulaire a cependant été remise en question dans l'immunité antivirale, qui pourrait impliquer un déploiement systémique de l'interférence ARN par propagation de grands ARN doubles brins (Saleh et al., 2009).

B. La réponse à l'infection épithéliale

La réponse immunitaire locale est également réalisée au niveau des épithélia (Figure 9 ; revu dans Ferrandon et al., 2007). En effet, ces tissus, en plus d'être des surfaces d'échanges impliquées dans la digestion, la respiration ou la reproduction, sont adaptés à la fonction de barrières à l'infection, aussi bien par leur anatomie décrite précédemment que par leur capacité d'induire une réponse immunitaire.

1) Un modèle bien caractérisé: la réponse dans l'intestin après infection orale bactérienne

La Drosophile se nourrit de fruits en décomposition et est donc en contact permanent avec des microorganismes au niveau de son tube digestif. L'élaboration d'un mode d'infection bactérienne expérimentale par voie orale a permis la caractérisation d'une réponse locale séquentielle.

a) Une réponse en plusieurs étapes

- Les réactifs oxygénés

Dès les premières minutes de l'infection, des réactifs oxygénés sont libérés en grande quantité dans l'intestin. Ceux-ci sont produits par l'enzyme Duox (dual oxidase), une NADPH oxydase membranaire (Ha et al., 2005a). Les réactifs oxygénés oxydent de façon non spécifique les molécules qui les entourent, et leur concentration dans l'intestin est très régulée, d'une part au niveau de leur production, par régulation de l'activité de Duox et de la transcription de son gène, d'autre part de leur dégradation par une catalase induite par l'infection, IRC (immune-regulated catalase) (Ha et al., 2005a; Ha et al., 2005b).

- Les AMP

La production d'AMP par les cellules épithéliales constitue une réponse complémentaire à la production des réactifs oxygénés : elle a un résultat plus spécifiquement antimicrobien, mais sa régulation transcriptionnelle lui impose un délai. En effet, certains AMP, en particulier la Diptéricine et l'Attacine, sont produits dans les cellules intestinales dans les heures suivant l'infection, sous régulation transcriptionnelle de la voie Imd (Tzou et al., 2000). Après infection orale, la plupart des bactéries induiront uniquement une réponse locale, tandis que certaines, telles que *P. entomophila*, sont également à l'origine d'une réponse systémique. La réponse locale apparaît comme fondamentale dans le contrôle de l'infection : en effet, une infection orale par cette espèce bactérienne est partiellement létale pour des mouches de lignées sauvages, mais l'induction préliminaire de la voie Imd s'avère protectrice (Liehl et al., 2006).

- Le renouvellement de l'épithélium

Après infection par *Ecc15*, de nombreux gènes impliqués dans le renouvellement intestinal sont induits (Buchon et al., 2009b). De plus, il a été mis en évidence que les cellules souches intestinales, éparpillées dans l'épithélium, se multipliaient en réponse aux dommages causés par l'infection, produisant de nouveaux entérocytes. Le renouvellement intestinal, régulé notamment par la voie JAK-STAT (Janus kinase – Signal transduction and activators of transcription), répond aux dommages de l'épithélium induits par le pathogène lui-même ainsi qu'aux dommages collatéraux causés par la production des réactifs oxygénés par Duox (Buchon et al., 2009a; Buchon et al., 2009b; Cronin et al., 2009; Jiang and Edgar, 2009).

La flore intestinale elle-même est régulée par ces trois mécanismes. Ainsi, la longévité des mouches se voit affectée, même en contexte non infecté, par interférence ARN sur Duox, du fait d'un développement non régulé des levures ingérées (Ha et al., 2009). De plus, le niveau de colonisation par la flore est corrélé avec le taux de renouvellement de l'épithélium (Buchon et al., 2009a). Cependant, une induction continue de la synthèse de réactifs oxygénés ou d'AMP amène également à une diminution de la longévité. La balance entre tolérance de la flore et induction de la réponse à l'infection est réalisée par divers régulateurs.

b) Une réponse hautement régulée

La réponse immunitaire intestinale est régulée à la fois en absence d'infection et après une infection. En conditions normales, il a été mis en évidence par interférence ARN que l'inactivation de certains contrôles de l'immunité basale aboutissait à une réduction de la longévité des mouches, liée à un déséquilibre entre les différentes espèces microbiennes de la flore. C'est le cas des régulateurs de Duox, mais aussi de Caudal, un régulateur négatif de Relish dans le noyau, en l'absence duquel la balance entre les espèces bactériennes de la flore est modifiée, alors dominée par une souche habituellement minoritaire, qui s'avère pathogène (Ha et al., 2009; Ryu et al., 2008).

Comme à l'échelle systémique, PGRP-LB se révèle être un régulateur-clé de la voie Imd dans l'intestin. En effet, l'inactivation de son gène par interférence ARN dans l'intestin mène à une activation prolongée de la réponse dans l'intestin, mais également à l'induction d'une réponse systémique dans le corps gras (Zaidman-Remy et al., 2006). Chez le mutant PGRP-LB, une infection orale en début de vie adulte n'entraîne pas de létalité directe mais un raccourcissement de la longévité (Welchman, en préparation). Ceci peut être lié à un effet toxique de la réponse, en particulier quand elle est permanente, ou aux pertes énergétiques engendrées par l'induction d'une telle réponse. L'inactivation de PGRP-LB mène également à l'induction locale de la voie Imd, en particulier dans le cardia larvaire, en absence d'infection (Zaidman-Remy et al., 2006). Cette réponse a été proposée comme le résultat d'une rupture de la tolérance à la flore (Zaidman-Remy et al., 2006). Ainsi, PGRP-LB interviendrait dans la tolérance à la flore en dégradant le peptidoglycane constamment présent en faible concentration dans l'intestin.

De façon similaire, l'inactivation de *pirk* et *dUSP36* par interférence ARN dans l'intestin mène à une activation continue de la réponse Imd, et le mutant *pirk* induit une réponse systémique à l'infection orale (Lhocine et al., 2008; Thevenon et al., 2009).

L'action combinée de ces régulateurs prévient donc à la fois une activation locale de la réponse à la flore intestinale et l'induction d'une réponse systémique superflue. En particulier, la tolérance à la flore semble dépendre de l'établissement d'un seuil en dessous duquel la réponse n'est pas déclenchée. Cet effet seuil est une réponse alternative au problème de l'initiation de la réponse immunitaire, mentionnée précédemment : en place d'une différence qualitative entre tolérance et induction d'une réponse, basée sur la présence de certains ligands, comme le propose C. Janeway, on aurait ici une différence quantitative, établie selon la concentration de ces ligands.

Si la réponse immunitaire intestinale est la mieux caractérisée, l'immunité épithéliale est également étudiée dans d'autres tissus. Divers épithélia produisent des AMP, de façon constitutive ou après induction par l'infection.

2) La réponse locale dans divers épithélia

Une caractérisation plus générale de la réponse épithéliale chez la *Drosophile* a été facilitée par la construction de lignées exprimant la GFP (Green fluorescent Protein) sous le contrôle des promoteurs de gènes codant chaque famille d'AMP (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000). Les épithélia des systèmes reproducteur, digestif et respiratoire expriment toute une combinaison d'AMP, de façon constitutive ou après infection.

a) *Au niveau de l'appareil génital*

Certains AMP sont exprimés de façon constitutive dans l'appareil génital, aussi bien chez le mâle que chez la femelle. En particulier, le canal éjaculateur du mâle produit de la Cécropine, et la spermathèque⁵ des femelles de la *Drosomycine* (Figure 9) (Tzou et al., 2000). L'existence d'une telle défense constitutive laisse supposer que des infections par voie génitale sont courantes chez la *Drosophile*. Une étude récente a en effet montré que des femelles pouvaient être infectées par *S. marcescens* après accouplement avec des mâles préalablement contaminés au niveau de l'appareil génital (Miest and Bloch-Qazi, 2008). De plus, il a été mis en évidence qu'une réponse immunitaire est induite chez la femelle lors de l'accouplement, par détection d'un constituant du sperme, le Sex peptide (Peng et al., 2005). Cependant, on ne sait pas si cette réponse est locale ou systémique. Ainsi, la production d'AMP semble prévenir l'infection génitale, par expression constitutive ou inductible par l'accouplement. La réponse de l'épithélium à la présence de bactéries au contact de l'épithélium génital n'a cependant pas été mise en évidence.

b) *Au niveau des trachées*

Les conduits respiratoires de la *Drosophile* produisent également des AMP. La *Drosomycine* est en particulier induite en forte quantité après infection

⁵La spermathèque est l'organe de stockage de spermatozoïdes, après l'accouplement

naturelle chez la larve, sous le contrôle de la voie Imd (Figure 9) (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000). Une analyse du transcriptome trachéen en conditions d'infection ou de surexpression de la voie Imd a confirmé l'induction de certains AMP, en particulier de la Drosomycine (Wagner et al., 2009). Elle a également mis en évidence des différences majeures entre ces deux conditions, laissant la question ouverte sur le contrôle de la réponse immunitaire dans les trachées, en dehors de la voie Imd. Parmi les gènes impliqués dans l'immunité, les auteurs de cette étude rapportent notamment l'induction de certains PGRP par cette infection, en particulier PGRP-SD, -LA et -LF, l'expression constitutive des deux derniers étant déjà enrichie dans ce tissu.

c) Au niveau des glandes salivaires

Les glandes salivaires excrètent des enzymes diverses impliquées dans la digestion, mais il a également été mis en évidence qu'elles produisaient des AMP. En particulier, la Drosomycine est exprimée de façon constitutive chez la larve, mais plus fortement chez l'adulte (Ferrandon et al., 1998). Une induction de la voie Imd dans les glandes salivaires par surexpression de PGRP-LC_x mène à l'expression de certains AMP, notamment la Diptéricine (Abdelsadik and Roeder, 2010). Une analyse comparative des transcriptomes de trachées et de glandes salivaires a mis en évidence que l'activation de la voie Imd induit des ensembles de gènes très différents dans ces deux tissus (Abdelsadik and Roeder, 2010; Wagner et al., 2009).

L'immunité épithéliale chez d'autres animaux

Chez les Vertébrés, il s'avère que les AMP interviennent à l'échelle locale uniquement : ils sont produits par les épithélia, ainsi que par des granulocytes neutrophiles, dans lesquels ils interviennent lors de la phagocytose. On distingue trois classes d'AMP chez les Mammifères : les défensines, les catélicidines et les histatines (Tzou et al., 2002a). Ces AMP sont présents au niveau des principales barrières de l'organisme. Ainsi, les β -défensines sont exprimées dans divers épithélia humains : au niveau de la bouche, de l'œil, du tractus génital, des poumons, des reins ainsi que sur la peau.

Des études récentes sur la symbiose Seiche-*Vibrio* ont mis en évidence que certains langages moléculaires intervenant dans les interactions hôtes-microbes étaient identiques dans une relation symbiotique et dans une situation d'infection (revu dans McFall-Ngai et al., 2010). Ainsi, la colonisation de la Seiche par *V. fisheri* induit une réponse épithéliale conduisant à la fermeture de l'organe lumineux. Ce processus implique notamment la reconnaissance de TCT

par EsPGRP1. Suite à cette colonisation, un PGRP catalytique, EsPGRP2, est produit par les cellules épithéliales et sécrété dans la cavité contenant les bactéries, contribuant ainsi à la tolérance du symbionte.

3) Complémentarité entre immunités locale et systémique

a) Une régulation bien différente

La régulation de la production d'AMP est en partie bien différente aux échelles systémique et locale. Notamment, la production d'AMP par le corps gras est uniquement induite en cas d'infection, alors que certains épithélia synthétisent des AMP de façon constitutive. En particulier, il a été mis en évidence que l'expression constitutive de la Cécropine dans le canal éjaculateur n'est pas sous le contrôle des voies Toll et Imd mais dépend des facteurs de transcription Caudal et vvl (Junell et al., 2010).

L'expression de certains AMP peut également être induite après infection dans divers épithélia. En particulier, l'expression de la *Drosomycine* dans les trachées est sous le contrôle de la voie Imd et non de la voie Toll, contrairement à la réponse systémique (Ferrandon et al., 1998). D'une façon générale, la voie Toll semble spécifique à la réponse systémique et n'a pas été caractérisée à l'échelle locale. Cela peut être lié à son mode d'initiation extracellulaire, alors que la voie Imd est activée par des récepteurs transmembranaires de façon autonome cellulaire, ce qui en fait une voie plus facilement régulée à l'échelle locale.

b) Intérêt de la compartimentalisation

La défense antimicrobienne est compartimentalisée au sein des épithélia, ce qui a deux conséquences principales. D'une part, la concentration en effecteurs dans un espace restreint atteint un niveau optimal à l'activité antimicrobienne rapidement et à moindre coût énergétique (Boman, 1995). D'autre part, la compartimentalisation limite la surface de contact des tissus avec les effecteurs, dont certains, tels que les réactifs oxygénés, induisent des dommages collatéraux aux cellules. Ces effets pourraient notamment expliquer que la production constitutive d'AMP a été exclusivement rapportée à l'échelle locale.

Seule une réponse locale est induite lors d'infections orales par la plupart des bactéries, et elle est suffisante à éliminer les bactéries. Cependant, certaines bactéries induisent une réponse à la fois locale et systémique. C'est le cas de *Ecc15* lors d'infections larvaires, et de *P. entomophila* lors d'infections de larves

et d'adultes (Basset et al., 2000; Vodovar et al., 2005). Il semble que l'induction de la réponse systémique ne soit pas liée à l'entrée de bactéries dans la cavité générale, mais plutôt à leur persistance accrue dans l'intestin. Ainsi, la réponse locale et la réponse systémique agissent non seulement simultanément, mais semblent résulter d'une communication entre tissus, déterminant le choix d'induire ou non une réponse dans le corps gras.

V. Le dialogue entre réponses locale et systémique

Lors d'infections locales, l'induction d'une réponse systémique, plus coûteuse en énergie, n'est réalisée que dans des cas particuliers et résulte du passage d'un signal entre l'épithélium infecté et le corps gras. Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence comme résultant d'un dialogue entre la réponse locale, en particulier au niveau de l'intestin ou des trachées, et la réponse systémique, par le corps gras.

A. Le dialogue entre intestin et corps gras

1) Un signal transmis par les hémocytes

La première observation d'une perte de communication entre l'intestin et le corps gras a été réalisée sur des larves mutantes pour *domino*. Celles-ci, affectées dans un gène de prolifération, sont en particulier dépourvues d'hémocytes, et elles n'induisent pas de réponse systémique après infection orale par *Ecc15*, contrairement aux larves de lignées sauvages (Basset et al., 2000; Braun et al., 1998). Plus récemment, il a été rapporté que la déplétion par apoptose des plasmatoctes résulte en une diminution de 30% de la proportion de larves induisant une réponse systémique, par rapport à des larves contrôles, et à une réduction de moitié de la transcription des gènes codant la *Diptéricine*, l'*Attacine A* et la *Défensine* (Charroux and Royet, 2009). La même étude confirme une réduction de l'induction systémique chez les mutants *domino*. Les hémocytes, et en particulier les plasmatoctes, semblent donc intervenir dans le dialogue entre épithélia et corps gras chez la larve. La phagocytose ne serait cependant pas nécessaire dans ce processus. En effet, ces phénotypes n'ont pas été observés chez le mutant *eater*, dont les hémocytes ont des capacités de phagocytose affaiblies (Charroux and Royet, 2009). Toutefois, les mécanismes de cette communication restent à préciser.

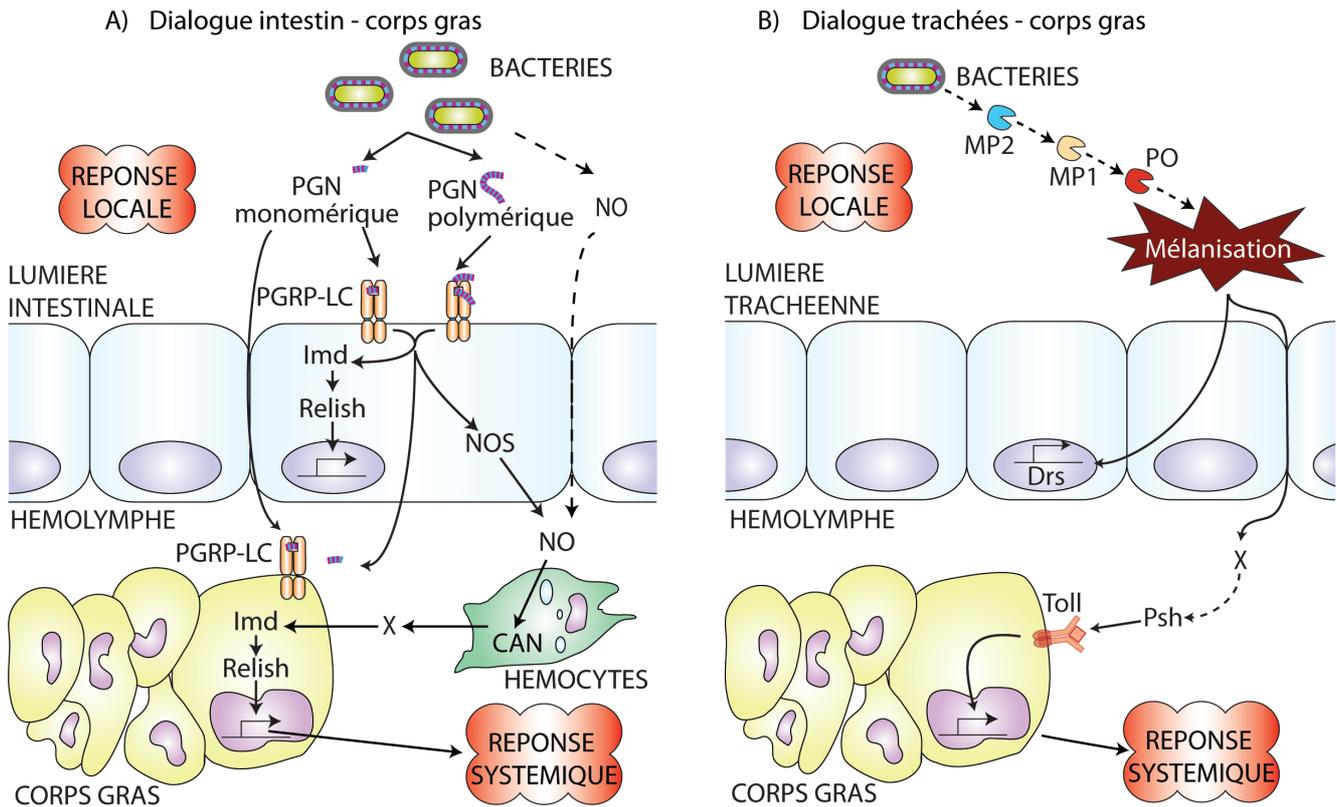


Figure 10: les dialogues entre épithélia et corps gras dans la réponse immunitaire

A. La communication entre intestin et corps gras est médiée par diffusion de PGN, en particulier monomérique, à travers l'intestin, et par diffusion d'oxyde nitrique (NO) ou synthèse d'oxyde nitrique par les cellules intestinales. La communication par l'oxyde nitrique est dépendante des hémocytes.

B. La mélanisation peut être induite dans les trachées par le biais d'une cascade d'activation de protéases à sérine, incluant MP2, MP1 et la phénoloxydase (PO). Un facteur produit lors de la mélanisation diffuserait à travers les trachées et induirait la voie Toll dans le corps gras d'une façon Perséphone (Psh) - dépendante

2) La translocation de peptidoglycane

L'induction d'une réponse systémique après infection locale peut être expliquée par deux hypothèses alternatives. Selon la première, l'induction d'une réponse locale induirait, en plus d'effecteurs antimicrobiens, la synthèse d'un second messager détecté par les cellules du corps gras, qui provoquerait l'activation d'une réponse systémique. La seconde propose que l'éliciteur de la réponse locale, le peptidoglycane, diffuse à travers l'épithélium et induise une réponse systémique.

Des expériences basées sur l'utilisation de peptidoglycane hautement purifié appuient cette deuxième hypothèse (Figure 10). En effet, l'ingestion de ce polymère est suffisante pour induire une réponse locale de la voie Imd, et également, chez des mouches déficientes pour l'amidase PGRP-LB, pour stimuler une réponse systémique (Zaidman-Remy et al., 2006). En absence de dégradation, l'accumulation de peptidoglycane serait donc à l'origine de l'induction d'une réponse systémique. Au vu de la taille des macromolécules de peptidoglycane, des monomères sont susceptibles de diffuser plus facilement à travers l'épithélium intestinal. Or l'ingestion de TCT, un monomère de peptidoglycane (voir III B 4), induit une réponse systémique chez les mouches sauvages, dont l'intensité est renforcée en absence de PGRP-LB (Zaidman-Remy et al., 2006).

Cependant, la translocation de peptidoglycane à travers l'épithélium intestinal n'a pas été démontrée. De plus, les deux hypothèses mentionnées ci-dessus ne sont pas nécessairement exclusives. En effet, il est envisageable que le peptidoglycane diffuse à travers l'épithélium et qu'un second messager sensibilise les cellules du corps gras, qui répondront alors plus fortement au peptidoglycane.

3) Un rôle pour l'oxyde nitrique ?

Après infection orale par *Ecc15*, des larves traitées par L-NAME, un inhibiteur de NOS (nitric oxide synthase), présentent un niveau affaibli d'induction de la *Diptéricine* et sont plus sensibles que leurs contrôles à l'infection (Foley and O'Farrell, 2003). Au contraire, une augmentation du niveau d'oxyde nitrique induit l'expression de la *Diptéricine* dans le corps gras, de façon Imd-dépendante, ainsi que dans les hémocytes. L'induction systémique n'est cependant pas observée chez le mutant *domino*. Selon les auteurs de cette étude, l'oxyde nitrique produit lors de l'infection orale par les cellules épithéliales active

la production d'un signal inconnu par les hémocytes, qui est à l'origine de l'induction de la voie Imd (Figure 10).

4) Synthèse sur le dialogue intestin – corps gras

Ainsi, le dialogue entre intestin et corps gras semble mettre en jeu les hémocytes, la translocation de peptidoglycane et la production d'oxyde nitrique. Il est possible que la translocation de peptidoglycane soit le mécanisme-clé de ce dialogue, et qu'elle soit réalisée notamment par les hémocytes. Notamment, il est à remarquer que l'étude concernant l'oxyde nitrique est parue avant la mise en évidence de la reconnaissance du peptidoglycane par les PGRP (Foley and O'Farrell, 2003; Gottar et al., 2002; Leulier et al., 2003). Il est donc possible que la participation de l'oxyde nitrique à la lyse des micro-organismes provoque le relargage de peptidoglycane, qui serait alors le signal intermédiaire transmis par les hémocytes. Cependant, il est également possible que les hémocytes produisent des molécules rendant les cellules du corps gras plus sensibles à l'induction de la voie Imd.

B. Le dialogue entre trachées et intestin

Une étude récente a aussi suggéré un lien entre la réponse immunitaire dans les trachées et la réponse immunitaire systémique, impliquant la mélanisation (Tang et al., 2008). Parmi les régulateurs de cette voie, la Serpin 77Ba est exprimée dans les trachées, où une inactivation locale de ce gène provoque la mélanisation en absence d'infection, aux stades larvaire, pupal et adulte ainsi que l'expression locale de la *Drosomycine* par la voie Imd. Chez ces mêmes larves, l'induction de la voie Toll a été observée dans le corps gras, par activation de la protéase à sérine Persephone. Le mécanisme de signalisation entre réponse locale et systémique reste cependant à déterminer : il a été proposé qu'un produit ou un intermédiaire réactionnel de la cascade de mélanisation encore inconnu diffuserait à travers l'épithélium trachéen et induirait la voie Toll dans l'hémolymphe, en amont de Persephone (Figure 10).

Contexte et objectifs de cette thèse

L'étude de la réponse immunitaire a été initiée par des analyses impliquant des infections par piqûre septique avec des culots bactériens très concentrés. Ces travaux ont mené à la caractérisation des deux principales voies d'activation de la réponse systémique : les voies Toll et Imd (revu dans Lemaitre and Hoffmann, 2007). Plus récemment, les recherches se sont engagées vers des analyses plus physiologiques de l'infection, ce qui a permis de mettre en évidence l'existence d'une réponse immunitaire épithéliale (Tzou et al., 2000). Celle-ci est déclenchée en cas d'accumulation de bactéries au contact d'un épithélium, et est donc sensible à la présence de bactéries dans l'environnement, en particulier dans sa nourriture, ce qui n'est généralement pas le cas de la réponse systémique. Cependant, certaines infections orales, notamment par les bactéries *P. entomophila*, induisent à la fois une réponse locale et une réponse systémique, alors que les bactéries restent localisées dans la lumière intestinale. Cette induction d'une réponse systémique implique donc un dialogue entre l'épithélium, qui est au contact des bactéries, et le corps gras, le tissu responsable de la réponse systémique.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux articulations entre la réponse locale épithéliale et la réponse systémique chez la *Drosophile*. Une étude réalisée précédemment dans le laboratoire avait abouti à une hypothèse selon laquelle le peptidoglycane, un constituant essentiel pour les bactéries, diffuserait à travers l'épithélium et induire la réponse directement au niveau du corps gras (Zaidman-Remy et al., 2006). Mes travaux de thèse ont révélé l'existence d'une telle diffusion dans un nouveau mode d'infection, par voie génitale. Plus exactement, j'ai mis en évidence que le dépôt de bactéries sur la plaque génitale mâle, suffisait à induire une réponse locale dans l'épithélium génital mais aussi une réponse systémique en absence de bactérie dans l'hémolymphe, et qu'un monomère de peptidoglycane purifié est détectable dans l'hémolymphe après dépôt génital.

Ma thèse concerne également l'analyse d'un PGRP de fonction encore inconnue, PGRP-LA. L'analyse du phénotype d'une lignée mutante pour ce gène m'a permis de montrer que PGRP-LA n'était pas nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire systémique après piqûre septique. Cependant, PGRP-LA apparaît nécessaire chez les larves au maintien d'une immunité basale dans les trachées. De plus, après infection orale, l'induction d'une réponse immunitaire dans le corps gras avoisinant les glandes salivaires semble altérée en absence de

PGRP-LA. Ce PGRP pourrait donc être impliqué chez la larve dans le dialogue entre réponse locale et systémique.

Mes travaux de thèse ont donc apporté de nouvelles informations sur l'immunité épithéliale, aussi bien basale, dans les trachées, qu'inductible, dans l'appareil génital. Ils ont également participé à l'élucidation des mécanismes impliqués dans les dialogues entre le corps gras et deux épithélia : les glandes salivaires et l'appareil génital mâle.

Resultats

I. Etude de l'activation à distance de la réponse systémique au moyen d'un nouveau mode d'infection

A. Introduction

Les relations hôte-pathogènes chez la *Drosophile* ont principalement été étudiées au moyen de deux modes d'infection. D'une part, la piqûre septique au moyen d'une fine aiguille recouverte de bactéries a permis d'étudier la réponse systémique, induite au niveau du corps gras. D'autre part, l'infection orale a permis de caractériser la réponse épithéliale dans l'intestin, mais aussi d'étudier les dialogues existant entre cet épithélium et le corps gras. Ces études ont abouti à la proposition d'un modèle selon lequel la communication entre intestin et corps gras serait en particulier médiée par la translocation de peptidoglycane bactérien à travers l'épithélium intestinal et induirait la réponse directement dans l'hémolymphe. La détection de peptidoglycane marqué dans l'hémolymphe permettrait de valider cette hypothèse. Cependant, une telle approche rencontrerait deux limites techniques : l'ingestion serait très consommatrice en peptidoglycane marqué, et il existerait un risque de percer l'intestin au cours du prélèvement de l'hémolymphe, ce qui reviendrait à détecter directement la TCT présente dans l'intestin.

En plus de l'intestin, divers épithélia sécrètent une combinaison de peptides antimicrobiens de façon constitutive ou inductible : en particulier, la *Drosomyicine* est induite par l'infection dans les trachées et la *Cécropine* est produite constitutivement dans le canal éjaculateur mâle. Il a de plus été mis en évidence que la réponse locale dans les trachées pouvait mener à l'induction d'une réponse systémique, et que l'accouplement induisait une réponse immunitaire chez la femelle, en réponse à un peptide produit par les glandes accessoires du mâle. Ces observations suggèrent que, en plus des modes d'infections couramment étudiés en laboratoire, d'autres modes d'infections sont d'importance dans la nature. De telles infections peuvent se mettre en place si des micro-organismes entrent par les orifices et s'accumulent au contact des épithélia. En particulier, l'accouplement pourrait être une source majeure d'infection, et il a déjà été montré comme un mode de transmission de bactéries du mâle à la femelle en

laboratoire. Les parties externes de l'appareil génital mâle possèdent en effet des infractuosités, où des bactéries peuvent s'accumuler.

Dans le projet présenté dans l'article qui suit, j'ai utilisé un nouveau type d'infection, par voie génitale, mettant en jeu une réponse à la fois locale, dans le canal éjaculateur, et systémique, dans le corps gras. La détection d'un monomère de peptidoglycane radioactif dans l'hémolymphe m'a permis de mettre en évidence la diffusion de ce composé à travers l'épithélium. Le peptidoglycane pourrait diffuser à travers l'épithélium soit par des transporteurs transmembranaires, soit par transcytose. Des résultats préliminaires non publiés suggèrent l'intervention des protéines impliquées dans l'endocytose et appuient donc la deuxième possibilité.

B. Article : Long-Range Activation of Systemic Immunity through Peptidoglycan Diffusion in *Drosophila*

Mathilde Gendrin, David P Welchman, Mickael Poidevin, Mireille Hervé, Bruno Lemaitre. PLoS Pathogens, 2009.

Long-Range Activation of Systemic Immunity through Peptidoglycan Diffusion in *Drosophila*

Mathilde Gendrin^{1,2}, David P. Welchman¹, Mickael Poidevin², Mireille Hervé³, Bruno Lemaitre^{1,2*}

1 Global Health Institute, EPFL, Lausanne, Switzerland, **2** Centre de Génétique Moléculaire (CGM), CNRS, Gif-sur-Yvette, France, **3** Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire Cellulaire, UMR 8619 CNRS, Université Paris-sud, Orsay, France

Abstract

The systemic immune response of *Drosophila* is known to be induced both by septic injury and by oral infection with certain bacteria, and is characterized by the secretion of antimicrobial peptides (AMPs) into the haemolymph. To investigate other possible routes of bacterial infection, we deposited *Erwinia carotovora* (*Ecc15*) on various sites of the cuticle and monitored the immune response via expression of the AMP gene *Diptericin*. A strong response was observed to deposition on the genital plate of males (up to 20% of a septic injury response), but not females. We show that the principal response to genital infection is systemic, but that some AMPs, particularly *Defensin*, are induced locally in the genital tract. At late time points we detected bacteria in the haemolymph of immune deficient *Relish^{E20}* flies, indicating that the genital plate can be a route of entry for pathogens, and that the immune response protects flies against the progression of genital infection. The protective role of the immune response is further illustrated by our observation that *Relish^{E20}* flies exhibit significant lethality in response to genital *Ecc15* infections. We next show that a systemic immune response can be induced by deposition of the bacterial elicitor peptidoglycan (PGN), or its terminal monomer tracheal cytotoxin (TCT), on the genital plate. This immune response is downregulated by PGRP-LB and Pirk, known regulators of the Imd pathway, and can be suppressed by the overexpression of PGRP-LB in the haemolymph compartment. Finally, we provide strong evidence that TCT can activate a systemic response by crossing epithelia, by showing that radiolabelled TCT deposited on the genital plate can subsequently be detected in the haemolymph. Genital infection is thus an intriguing new model for studying the systemic immune response to local epithelial infections and a potential route of entry for naturally occurring pathogens of *Drosophila*.

Citation: Gendrin M, Welchman DP, Poidevin M, Hervé M, Lemaitre B (2009) Long-Range Activation of Systemic Immunity through Peptidoglycan Diffusion in *Drosophila*. PLoS Pathog 5(12): e1000694. doi:10.1371/journal.ppat.1000694

Editor: David S. Schneider, Stanford University, United States of America

Received: May 1, 2009; **Accepted:** November 17, 2009; **Published:** December 18, 2009

Copyright: © 2009 Gendrin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The laboratory of B.L. was funded by the Schlumberger and Bettencourt Foundations, the Programme Microbiologie (PRMMIP00) and the Fonds National Suisse, and M.H. is funded by the Centre National de la Recherche Scientifique. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bruno.lemaitre@epfl.ch

Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of innate immunity. They are ubiquitous throughout the animal and plant kingdoms, reflecting the importance of these molecules in host defence. In *Drosophila* over 20 AMPs, divided into seven classes, have been described [1]. These Insect AMPs are thought to be active against microbial membranes and exhibit specificity of activity against Gram-negative bacteria (e.g. Diptericin), Gram-positive bacteria (e.g. Defensin) or fungi (e.g. Drosomycin).

Drosophila AMPs are induced in the fat body, an analogue of the mammalian liver, in response to both septic injury and oral infection with certain bacteria. This response is referred to as the systemic response because it leads to secretion of AMPs into the haemolymph, which bathes all tissues. The systemic response has been well characterised and is regulated at the transcriptional level by the Toll and Imd pathways [2,3]. The Toll pathway is induced by both Gram-positive bacteria and fungi, via circulating pattern recognition receptors, and leads to the activation of NF-κB proteins (Dif and Dorsal), controlling the production of AMPs active against fungi. In contrast, the Imd pathway mainly responds to Gram-negative bacterial infection and controls antibacterial peptide genes via the activation of the NF-κB-like protein Relish.

PGRP-LC, one of several Peptidoglycan Recognition Proteins in *Drosophila*, acts as a membrane-bound pattern recognition receptor that activates the Imd pathway upon sensing of DAP-type Peptidoglycan (PGN) [4,5,6]. PGN is a cross-linked polymer which is an essential component of all bacterial cell walls. DAP-type PGN, which contains a diaminopimelic acid (DAP) moiety, is limited to Gram-negative bacteria and some Gram-positive bacilli, while the Lys-type PGN of most Gram-positive bacteria contains Lysine instead of DAP.

Drosophila AMP genes are also expressed in barrier epithelia such as the epidermis, reproductive system, respiratory tract and digestive tract, which are exposed to environmental microorganisms and/or indigenous flora [7,8,9]. This AMP synthesis is referred to as the local immune response, as opposed to the systemic response. It is important, in epithelia, to distinguish between constitutive and inducible AMP gene expression. Some AMP genes are expressed constitutively, in specific tissues, in the absence of infection. This is the case for *Drosomycin* in salivary glands and the female spermatheca [7], for *Drosocin* in the ovaries [10] and for *Cecropin* in the male ejaculatory duct [11]. This constitutive expression is not regulated by NF-κB pathways but by various tissue-specific transcription factors such as the homeobox-containing protein Caudal [12]. By contrast, the inducible local

Author Summary

Innate immunity is the first line of antimicrobial defence for vertebrates and the only immune response present in invertebrates such as the fruitfly *Drosophila*, which provides a powerful model system to study innate immunity. Interestingly, local infections of epithelia like the gut and, in our study, the genital tract, result not only in a local immune response, but in an immune response of the whole body. The latter seems to protect *Drosophila* against the potential spread of local infections. We have investigated the immune response to bacteria placed on the genitalia, at the entrance to both the genital tract and hindgut. This could be a natural entry route of pathogens, possibly linked to sexually transmitted infections. We observe a strong immune response to Gram-negative bacteria, mediated by the immune responsive Imd signalling pathway. This response depends on peptidoglycan, a crucial component of the bacterial cell wall, as pure peptidoglycan placed on the genitalia is sufficient to trigger a whole body immune response. Finally, we present strong evidence that peptidoglycan fragments within the genital tract or hindgut can cross these epithelia, enter the body cavity and thus induce a system wide immune response to a local infection.

AMP gene expression is triggered upon infection by Gram-negative bacteria and is mediated by the Imd pathway [8,13,14]. For example, *Drosomycin* and *Diptericin* are induced in both trachea and gut in response to local infections by bacteria such as *Erwinia carotovora*. Like the systemic response, the local immune response is based on the recognition of Gram-negative PGN by PGRP-LC [15].

In addition to the immune response to infection, AMP expression has also been shown to be stimulated by mating, in females [16]. Surprisingly, this induction appears to be independent of any microbial elicitor. Indeed, experimental data support the idea that accessory gland proteins, including Sex Peptide, present in the sperm of males, are sufficient to induce a local AMP gene expression in the female genitalia. This immune response may limit the propagation of potential infectious agents just after

copulation. This may be particularly important following female genital wounding, which has been shown to occur during copulation in *D. melanogaster* [17].

These recent observations have shown that the genes encoding AMPs are expressed in more sophisticated and differentiated patterns than were previously anticipated [9]. The expression of AMP genes appears to be specifically regulated both locally and systemically. In addition to some constitutive expression, they can be induced upon infection and upon mating. The starting point of this study was to investigate additional possible routes of infection and analyse whether Insects could sense the presence of bacteria through their cuticle, leading to expression of AMP genes. Here, we show that deposition of bacteria on the genital plate of males is sufficient to activate both systemic and local immune responses. Our results strongly suggest that the translocation of small fragments of PGN into the haemolymph triggers a protective systemic response upon genital infection.

Results

External genitalia application of bacteria activates an Imd pathway dependent immune response

We wondered if flies are able to sense the presence of potentially infectious microorganisms in contact with their external cuticle. Entomopathogenic fungi have been shown to be able to cross the cuticle barrier and thereby activate an immune response [18], but to date bacteria have only been shown to activate an immune response by direct introduction into the haemolymph (septic injury) or by oral infection. To address this question, we deposited Gram-negative bacteria on various sites of the cuticle of adult males and monitored the systemic immune response 6h later, by the expression of the AMP gene *Diptericin* in whole flies. Deposition of a droplet of the Gram-negative bacteria *Erwinia carotovora 15* (*Ecc15*, OD₆₀₀=200) on the head, thorax or abdomen, with a paintbrush, results in modest induction of *Diptericin* corresponding to less than 6% of the expression level observed after septic injury. In contrast, we observed that deposition of bacteria on the genital plate (see Figure 1A) reproducibly results in a substantial level of *Diptericin* expression, corresponding to 10 to 20% of the level obtained after septic injury (Figure 2A,B).

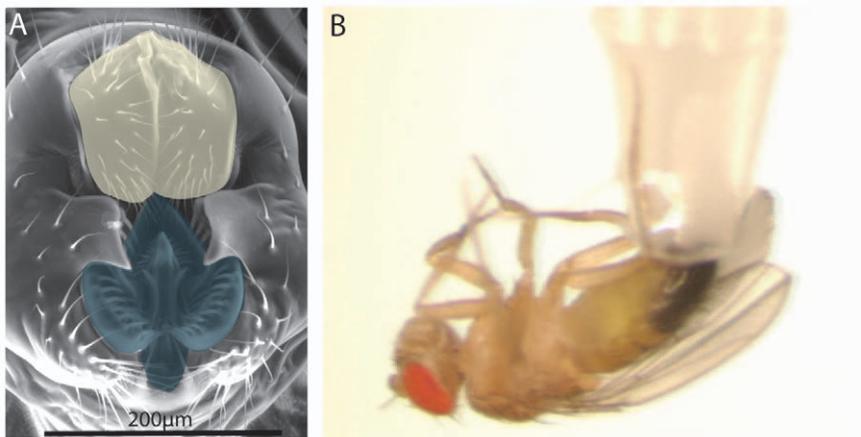


Figure 1. Infection of *Drosophila* males through the genitalia. (A) A scanning electron microscopy image of the male genital plate (kindly provided by Jagadeeshan and Singh). Note the complex cuticular structures surrounding the anal (yellow) and genital (blue) openings. Scale bar = 200µm. See also Jagadeeshan and Singh [46]. **(B)** GI of males was performed by depositing about 30nL of bacteria or microbial products on the genital plate using a 200µL tip as illustrated. doi:10.1371/journal.ppat.1000694.g001

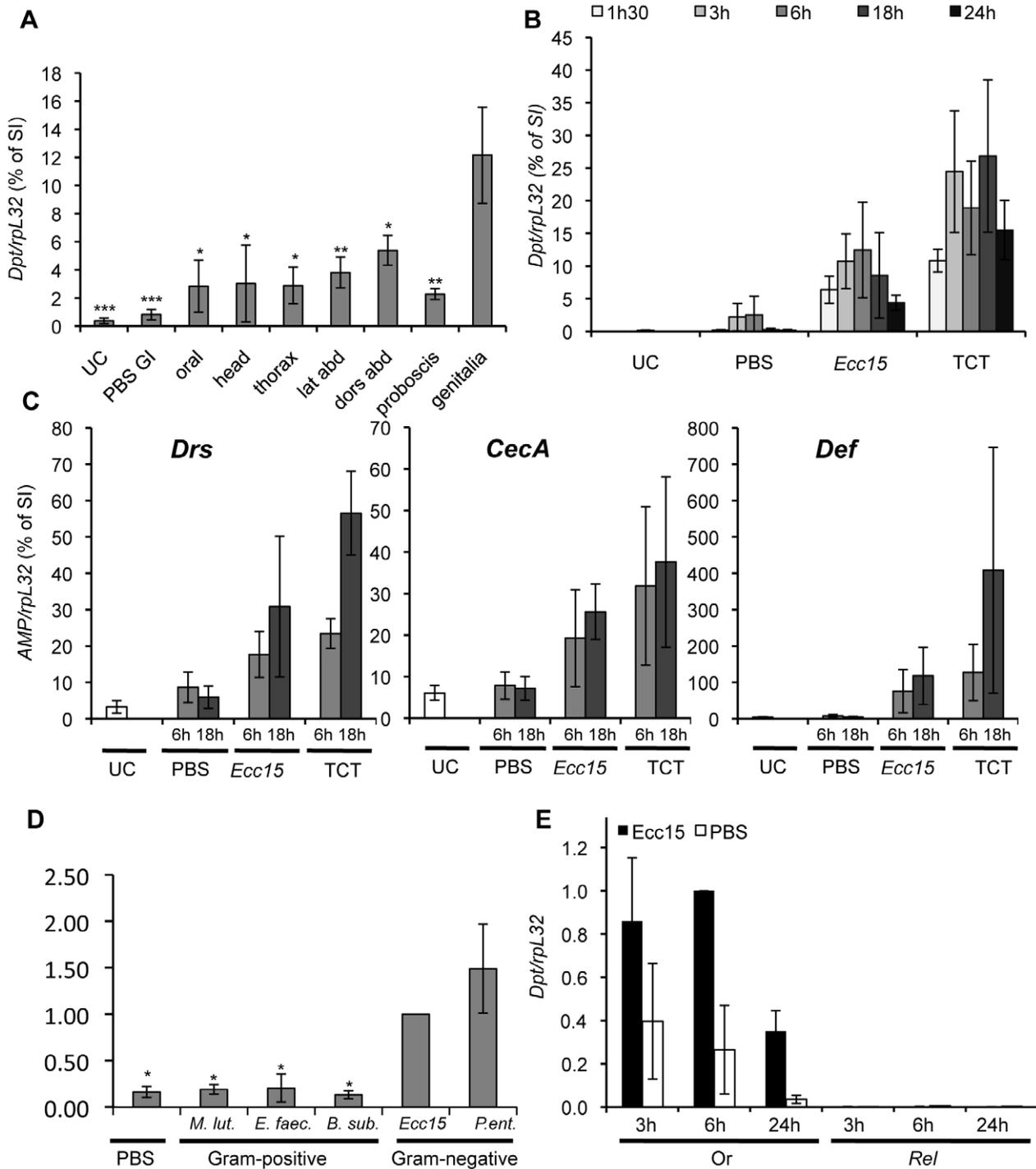


Figure 2. RT-qPCR experiments reveal that genital infection induces an immune response via the Imd pathway. (A) Expression profile of *Dpt* following deposition of *E. carotovora* bacteria (*Ecc15*) on various regions of the cuticle. *Dpt* was measured by RT-qPCR, 6h after deposition of around 30nL of bacteria ($OD_{600} = 200$) on various parts of the cuticle. Deposition of PBS on the genitalia (PBS GI) was used as a control. lat – lateral; dors – dorsal; abd – abdomen. (B) Time-course analysis of *Dpt* response after genital deposition of PBS, *Ecc15* or TCT. (C) Expression profile of *Drosomycin* (*Drs*), *CecropinA* (*CecA*) and *Defensin* (*Def*) in flies collected 6h (light grey) or 18h (dark grey) after genital deposition of PBS, *Ecc15* or TCT. (D) *Dpt* expression in flies 6h after GI by various bacteria: *M. luteus* (*M. lut.*), *E. faecalis* (*E. faec.*), *B. subtilis* (*B. sub.*), *E. carotovora* (*Ecc15*) and *P. entomophila* (*P. ent.*). (E) Time-course analysis of *Dpt* expression in control OregonR (*Or*) and *Relish*^{E20} (*Rel*) flies after GI with *Ecc15*. Wild-type (Oregon^R) flies were used, except where otherwise noted. In A–C, results are shown as a percentage of the *Dpt/rpL32* ratio of flies collected 6h after septic injury (SI) with *Ecc15* in the same experiment. In D–E the *Dpt/rpL32* ratio is normalised to the expression level 6h after *Ecc15* GI infection of wild-type flies. Data are the mean of 3 (B, C, E), 4 (A, D) or 8 (A: UC, PBS, dors abd, lat abd, genitalia) repeats, error bars show the standard error. In A and D, statistical analysis was performed using a Kruskal-Wallis test across all treatments ($p = 0.016$ in A, $p = 0.009$ in D), followed by a Tukey test for pair-wise comparisons of genital deposition of *Ecc15* to the other treatments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). UC – unchallenged, *Dpt* – *Diptericin*. doi:10.1371/journal.ppat.1000694.g002

For all further experiments, genital infection (GI) was performed by applying 20–50nL of bacterial pellet using a 200µl pipette tip (see Figure 1B) depositing a droplet without touching the genital plate itself. A kinetic analysis reveals that *Diptericin* expression is already detectable at 1.5h post GI, reaches its maximum between 6 and 18h and decreases thereafter (Figure 2B). RT-qPCR analysis also indicates that GI triggers the expression of all the families of AMPs known to be induced in the systemic immune response (Figure 2C and Figure S1). Of all the AMP genes, *Defensin* exhibited the highest level of expression upon GI, reaching levels comparable to those observed in response to a systemic infection. Importantly, *Diptericin* expression in females, following an equivalent deposition of bacteria on the abdominal terminalia, was very low, with a maximum of 5% of the level observed after septic injury, indicating that the observed immune reactivity is specific to the male genitalia (data not shown). Since mating can induce wounding of the genital plate (at least in females [17]), we compared the response of mated to unmated males and found that the response was similar or slightly higher in unmated males (Figure S2). All subsequent experiments were performed with males from stocks, which were likely mated.

The genital plate is distinct from the other cuticle sites on which bacteria were deposited in that it includes openings to both the gut and genital tract. It should be noted however that other deposition sites included spiracles, opening into the trachea, and the proboscis, opening into the foregut. Thus the presence of openings into epithelial organs is not in itself sufficient to allow a systemic response to bacterial deposition on the cuticle.

Systemic expression of AMP genes is regulated by both the Toll and Imd pathways, which are activated by different classes of microbes in *Drosophila*. We investigated the range of bacteria to which a response to GI occurs and observed that AMP genes are induced only upon GI by Gram-negative but not by Gram-positive bacteria (Figure 2D and S1). This suggests that the Imd pathway mediates the response to GI and, indeed, *Diptericin* gene expression upon GI was abolished in *Relish^{E20}* mutant flies that lack a functional Imd pathway (Figure 2E).

Our results indicate that male flies react strongly to the presence of bacteria deposited on the genital plate. The genital plate is a complex cuticular structure that provides many sites where bacteria could accumulate (see Figure 1A). Furthermore, since it includes both the anal and genital openings, it could provide a route of entry for potential pathogens into the digestive and/or genital tracts.

The immune response to genital infection protects against colonisation of the haemocoel

To test if the genital plate is indeed a site of entry for bacteria into organs and into the haemolymph, we investigated the fate of living bacteria during GI. We monitored the fate of GFP expressing *Ecc15* (*Ecc15-GFP*) deposited on the genital plate and observed that, after 9h, GFP was still present at the infection site in 90% of the flies. In contrast, only 50% of the flies still show GFP signal when bacteria were deposited on the side of the abdomen (data not shown). This suggests that the genitalia offer a better niche for the persistence of bacteria than the cuticle in general. We further observed that, after 24h, some flies which had had bacteria deposited on their abdomen exhibited bacteria on the genitalia, suggesting that bacteria washed from the body are able to infect the genitalia. Dissection of the genital tract of genitally infected flies revealed small quantities of fluorescent bacteria within the ejaculatory bulb and duct although the majority appears to remain on the external genitalia (data not shown).

We did not detect any difference between *Ecc15-GFP* persistence on the outside of the genitalia in *Relish^{E20}* and wild-type flies. However, by dissecting flies 24h after GI, we observed fluorescent bacteria in the body cavity of 19% of *Relish^{E20}* flies (5/27), while no bacteria were found inside wild-type flies (n = 20). In order to verify the presence of live *Ecc15-GFP* we extracted haemolymph from genitally infected flies and plated the extracts, under Rifampicin selection for *Ecc15*. Live *Ecc15-GFP* were present in the haemolymph of 20% of *Relish^{E20}* flies (4/20) but none were present in the haemolymph of wild-type flies (n = 20). Although a systemic immune response is already detected at 1.5h after GI, no bacteria were detected in the haemolymph at this time point, in either wild-type or *Relish^{E20}* flies, by direct observation of fluorescence. We cannot exclude however that small numbers of bacteria, below our limit of detection, were present. Consistent with the presence of bacteria in their body cavity, we observed a weak but significant mortality after GI with *Ecc15* in *Relish^{E20}* flies (Figure 3A). We also observed mortality in both wild-type and, more strongly, *Relish^{E20}* flies after GI with a strain of *Pseudomonas aeruginosa* (CFBP2466), further suggesting that the genital plate provides a favourable route of infection in *Drosophila* (Figure 3B). These experiments demonstrate a role of the Imd pathway in controlling the progression of genital infections, preventing bacteria from entering the haemolymph.

The immune response to genital infection is largely systemic

Two bacterial strains, *Ecc15* in larvae and *Pseudomonas entomophila* in both larvae and adults, have been shown to be able to activate both local and systemic responses upon oral infection [13,19]. To determine which tissues express AMPs upon GI with *Ecc15*, we used RT-qPCR to compare the expression levels of *Diptericin* in whole flies to those in dissected genital tracts, fat bodies (carcasses) and guts, 6h after infection. Figure 4A shows that *Diptericin* is most strongly expressed, upon GI, in the fat body. Using a *Diptericin-lacZ* reporter gene, we observed a strong fat body expression in about 20% of the males after GI (Figure 4B). Thus the *Diptericin* expression observed in whole flies is mostly due to a strong systemic induction in only 20% of the infected individuals. By contrast, *Diptericin* expression was induced in the fat body of 100% of flies subjected to septic injury.

In order to visualise the local immune response, we studied *Diptericin-lacZ* expression in the gut and genital tract. In contrast to oral infections, relatively little induction was observed in the gut (Figure 4C). In the genital tract, we monitored *Diptericin-lacZ* expression upon GI in *Galⁿ¹* flies lacking the endogenous β -galactosidase gene, as endogenous β -galactosidase is expressed in the ejaculatory bulb. We observed a weak induction of the transgene in the seminal vesicle, the ejaculatory duct and ejaculatory bulb (Figure 4D). By qRT-PCR we observed that this induction is dependant on the Imd pathway (Figure S3).

We extended this analysis to other AMPs, using qRT-PCR and *AMP-GFP* reporter genes. Interestingly, we observed that GI specifically triggers a very strong induction of *Defensin* in the genital tract of males (Figure 4A) and that this induction is dependent upon the Imd pathway (Figure S3). Observation of flies expressing the *Defensin-GFP* reporter gene reveals that this expression is localised to the thin part of the ejaculatory duct (Figure 4E). We also confirmed previous observations that a *Cecropin A-GFP* reporter gene is strongly expressed in the ejaculatory duct in the absence of infection [8,11] (data not shown), and expression analysis of the endogenous gene showed a slight induction upon GI (Figure 4A).

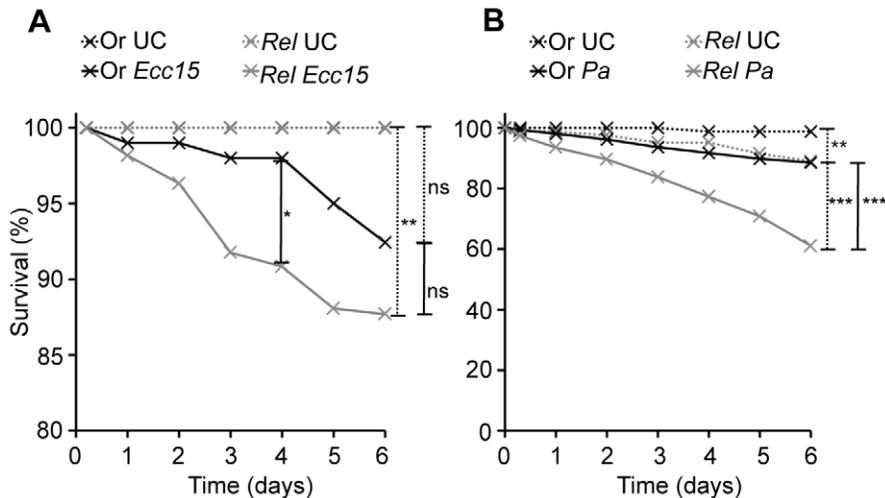


Figure 3. Immune deficient flies are more susceptible to genital infection. Survival analysis of wild-type (Or) and *Relish^{E20}* (*Rel*) flies upon GI with *Ecc15* (A) and *P. aeruginosa* (*Pa*) (B). Unchallenged (Or UC and *Rel* UC) flies were used as controls. The Kaplan-Meier log rank test was used to determine statistical significance. Dashed brackets represent the significance between unchallenged and infected flies and solid brackets between infected flies of different genotypes (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns = not significant). In A, *Rel Ecc15* is significantly different from *Or Ecc15* only after 4 days, but not later. The scale of the Y-axis in A has been modified to enable a better discrimination between the curves. Data are means of four independent experiments.
doi:10.1371/journal.ppat.1000694.g003

We conclude that deposition of bacteria on the genital plate is sufficient to activate both a systemic and a local immune response in *Drosophila* males. Most of the *Diptericin* expression observed in these flies corresponds to fat body expression. This indicates the existence of a link between genitalia and the fat body immune response.

Genital application of purified Gram-negative PGN mimics a genital infection

The observation that deposition of bacteria on the genital plate induces a systemic immune response could be explained either by the invasion of haemolymph by bacteria or by the existence of an immune signal between genitalia and the fat body. Recently, it has been proposed that PGN translocation through the gut could be a mechanism that activates the systemic immune response upon oral bacterial infection with *P. entomophila* or *Ecc15* [15]. Our observation that systemic *Diptericin* expression was detectable before bacteria were observed in the haemolymph of even immune deficient flies, suggests that a similar mechanism explains the systemic response to GI.

To distinguish between direct sensing of bacteria in the haemolymph and remote sensing of bacteria present in the genital tract and/or hindgut, we compared the systemic immune response, as monitored by the level of *Diptericin* expression, upon GI with living or dead bacteria. Figure 5A shows that dead bacteria activate a systemic immune response with a similar, or higher, efficiency to live bacteria. This demonstrates that the induction of a systemic response is not mediated by the crossing of the epithelial barriers by live bacteria but rather results from the release of bacterial elicitors. Monomeric or polymeric DAP-type PGNs of Gram-negative bacteria are the most potent inducers of the Imd pathway. This prompted us to analyze the effect of PGN deposition on the genital plate. As shown in Figure 5B, deposition of highly purified PGN from *Ecc15* activates a systemic immune response to the same, or greater, extent as live bacteria. Comparing the responses to PGN from different bacteria we found that DAP-type PGNs of Gram-negative *Ecc15* or *P.*

entomophila induce a strong response, whilst PGNs from Gram-positive bacteria, either DAP-type from *B. subtilis* or Lys-type from *M. luteus*, activate little or no response (Figure 5C).

The GlcNAc-MurNAc(anhydro)-L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala monomer, also known as tracheal cytotoxin (TCT), was previously identified as the minimum PGN motif capable of efficiently inducing the Imd pathway [5,6]. TCT provides an ideal “signature” of Gram-negative bacteria since this mucopeptide is continuously released during cell growth and division as a result of PGN recycling [20]. We observed that GI with TCT strongly induces AMP genes (Figures 2B and C). It has been proposed that TCT released by cleavage of the PGN polymer can cross epithelia to activate an immune response. If this were the case, then TCT should induce a stronger systemic immune response than polymeric PGN. To compare the immune response to TCT or polymeric PGN, we deposited around 30nL of HPLC-purified TCT or PGN on the genital plate at (monomer equivalent) concentrations respectively of 1mmol.L⁻¹ and 5mmol.L⁻¹. Injecting serial dilutions of TCT or PGN, starting at these concentrations, the immune response to PGN is always the same or higher than that to TCT (Figure S4). By contrast, the response to genital deposition of 1mmol.L⁻¹ TCT was particularly strong, three times the response to genital deposition of 5mmol.L⁻¹ PGN at the 6h time point (Figure 5B). These results show that the systemic activation of AMP genes in response to GI can be mediated through the sensing of TCT or small fragments of PGN and does not require the presence of live bacteria. They further suggest that this sensing takes place in the haemolymph.

Imd pathway regulators limit the immune response to genital infection

Recent studies in *Drosophila* have revealed that multiple levels of regulation limit Imd pathway activity and prevent excessive or prolonged immune activation [3]. A key role in bacterial tolerance of the gut has been attributed to the amidase PGRPs, PGRP-SC1 and PGRP-LB, as they are proposed to scavenge PGN released by

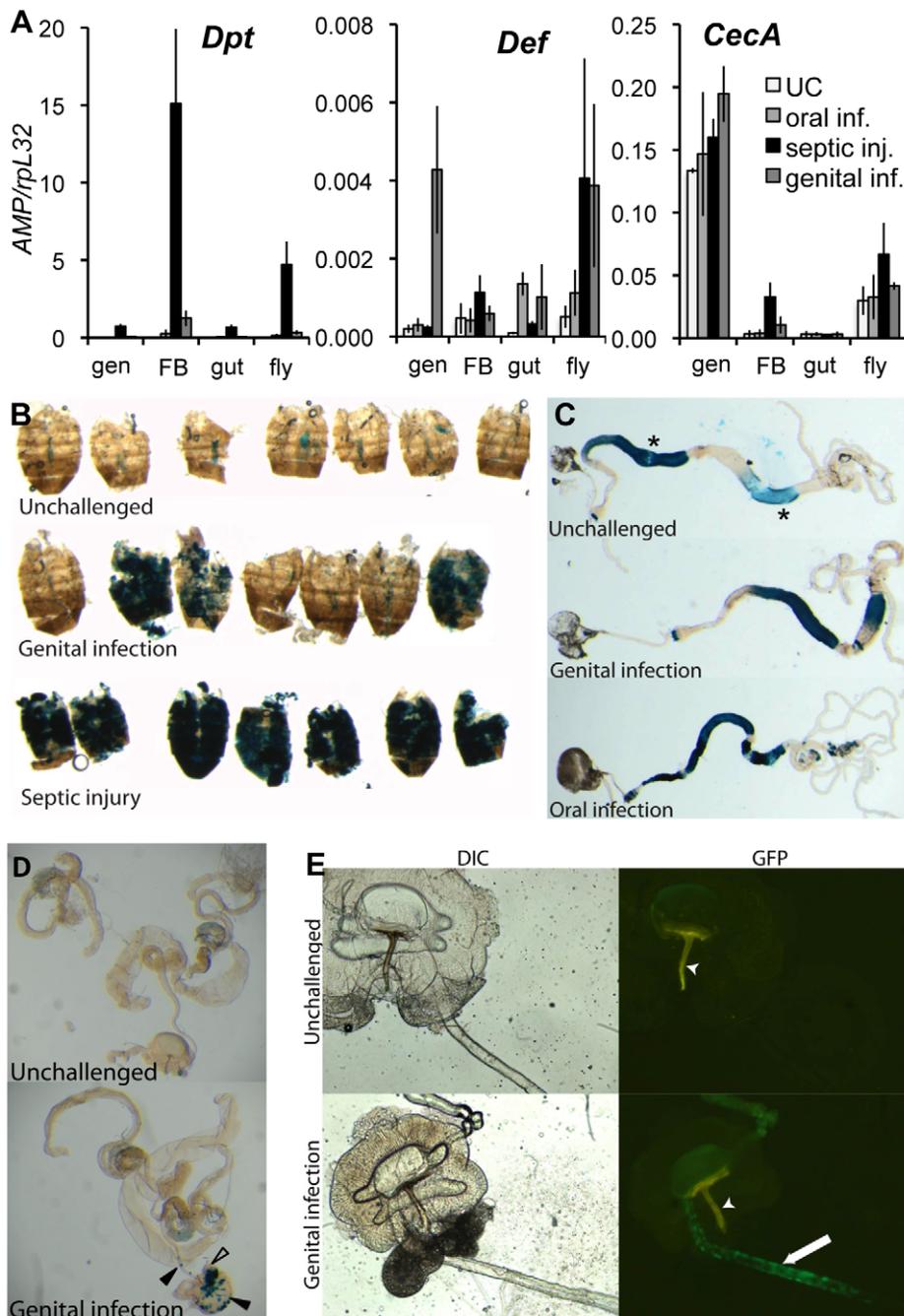


Figure 4. Genital infection induces both systemic and local immune responses. (A) RT-qPCR analysis of *Dpt*, *Def* and *CecA* expression in the genital tract (gen), the abdominal carcass (corresponding mostly to fat body, FB), the gut (including Malpighian tubules) and in whole flies, following oral infection, septic injury or GI with *Ecc15* (6h). (B–D) GI triggers *Dpt-lacZ* reporter gene expression in the fat body (B), the gut (C) and the genital tract (D). β -galactosidase stainings were performed on fat body, gut and genital tract from wild-type flies (B,C), or *Gal¹¹* flies (deficient for the gene encoding endogenous β -galactosidase) (D), carrying a *Dpt-lacZ* reporter gene. Flies were collected 6h after GI, septic injury or oral infection with *Ecc15*. GI triggers a strong expression of *Dpt-lacZ* in the fat body of around 20% of adults (B). A low level of β -galactosidase activity (asterisks) corresponding to the endogenous *Gal* gene expression was observed in the gut of unchallenged flies (C). Upon GI *Dpt-lacZ* was induced weakly in the gut in around half of infected flies, while oral bacterial infection triggers a strong expression of the reporter in various gut segments (C). In the genital tract, GI triggers *Dpt-lacZ* in the ejaculatory bulb and internal ejaculatory duct (arrowheads, D). Note that the *Dpt-lacZ* reporter gene was also induced in an uncharacterised structure (empty arrowhead, D), attached to the ejaculatory bulb. This structure appears to be a convolution or overgrowth of the external ejaculatory duct leading from the ejaculatory bulb to the terminalia. Although it was not observed in all flies, its presence was not correlated with infection. (E) *Def-GFP* expression (green) is induced in the internal ejaculatory duct (arrow) 17h after GI with *Ecc15*. The apodeme (arrowhead) is strongly autofluorescent (yellow). In A the mean of three repeats is shown, error bars are standard error. In B–E, one representative experiment out of 3 repeats is shown. doi:10.1371/journal.ppat.1000694.g004

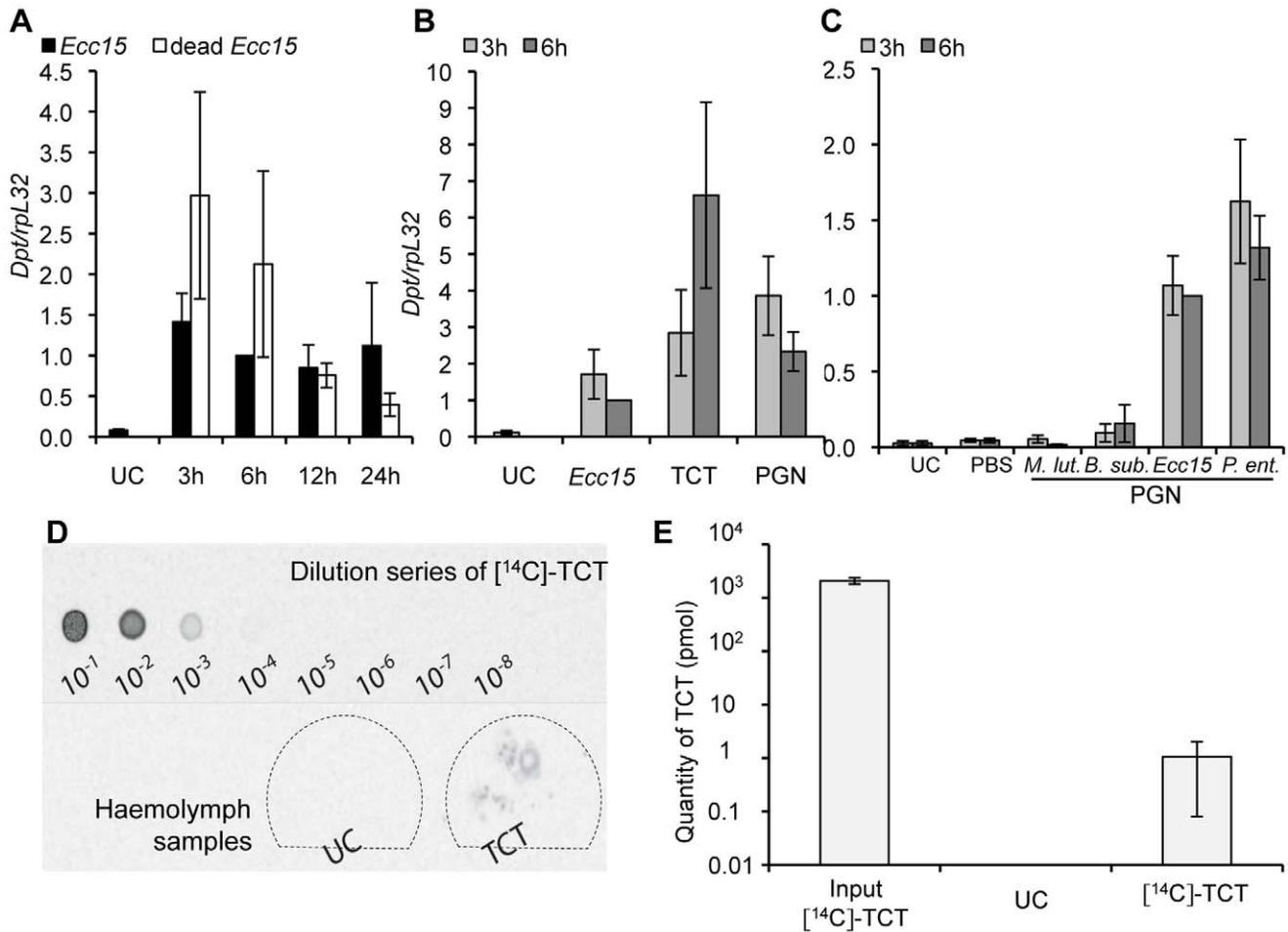


Figure 5. TCT is sufficient to induce an immune response and is translocated into the haemolymph. (A–C) RT-qPCR analysis of *Dpt* expression following deposition on the genital plate of live or dead *Ecc15* (A), PGN and TCT compared to *Ecc15* (B) or PGN extracted from various bacterial species compared to PBS (C). Data are means of three repeats, error bars are standard errors. UC: Unchallenged, *M.lut.*: *M. luteus*, *B.sub.*: *B. subtilis*, *Ecc15*: *E. carotovora*, *P.ent.*: *P. entomophila*. The *Dpt/rpL32* ratio is shown normalised to expression in flies 6h after genital challenge with either live *Ecc15* (A,B) or with *Ecc15* PGN (C). Wild-type (Oregon R) flies were used, except in B, where the flies used were the progeny of *da-Gal4* crossed to *w¹¹¹⁸*. (D) [¹⁴C] labelled TCT was deposited on the genital plates of flies and haemolymph extracted two hours later. This experiment was repeated three times. Depicted is a representative scan of a phosphor-imager screen exposed to filter papers containing: Upper panel: 1μL drops of serial 1/10 dilutions of the [¹⁴C]-TCT solution deposited on the flies. There is signal saturation in the 10⁻¹ drop. Lower panel: Haemolymph of unchallenged flies (UC) or flies where [¹⁴C]-TCT was deposited on the genital plate (TCT). The dashed lines represent the form of the filter papers. (E) Quantification of [¹⁴C] present in extracted haemolymph. Raw data were obtained as a percentage of the intensity of the 10⁻² drop, and are presented here as the quantity of TCT (pmol) calculated from the known concentration of the [¹⁴C]-TCT source and the volume used to infect flies. Data shown are the mean of 3 repeats, error bars show standard error. doi:10.1371/journal.ppat.1000694.g005

gut microbes [15,21]. An additional negative regulator, Pirk (also named Pims or Rudra), has been recently identified as an Imd immune responsive factor which removes the receptor PGRP-LC from the membrane, thereby shutting down Imd signalling [22,23,24]. We investigated the roles of PGRP-LB, Pirk and PGRP-LC in the immune response upon GI. As shown in Figure 6A, *Diptericin* was induced, upon deposition of TCT on the genitalia, at a higher level in flies subjected to ubiquitous *PGRP-LB* RNAi (with a *da-Gal4* driver) than in control flies. Furthermore, ubiquitous overexpression of *PGRP-LB* suppresses *Diptericin* induction by TCT. Specific overexpression of *PGRP-LB* in the fat body and haemocytes (with a *c564-Gal4* driver) also suppressed the induction of *Diptericin* by TCT (Figure 6B). This result demonstrates that the presence of the amidase PGRP-LB in the haemolymph compartment blocks the systemic immune response to GI, presumably by degrading fragments of PGN entering the

haemolymph. Interestingly, RNAi of *PGRP-LB* in the fat body (driven by *c564-Gal4*) has a less reproducible effect than ubiquitous RNAi of *PGRP-LB* (Figure 6A,B), suggesting that PGRP-LB normally plays a more important role outside the haemolymph, in limiting the availability of PGN fragments capable of entering the haemolymph. However, the lack of a Gal4 driver expressed specifically in the male genital tract prevented us from testing whether it is in this tissue that PGRP-LB is required to limit the systemic response to GI. In keeping with the model of TCT entering the haemolymph, we observed that selective depletion of PGRP-LC in the fat body blocks the systemic immune response to TCT (Figure 6B). Similarly, *PGRP-LC^{E12}* mutant flies show no systemic response to GI with *Ecc15* (Figure 6C). Finally, we observed a higher immune response to GI in *pirk* deficient flies, the level of *Diptericin* expression being 2.5 fold higher than in wild-type flies (Figure 6C).

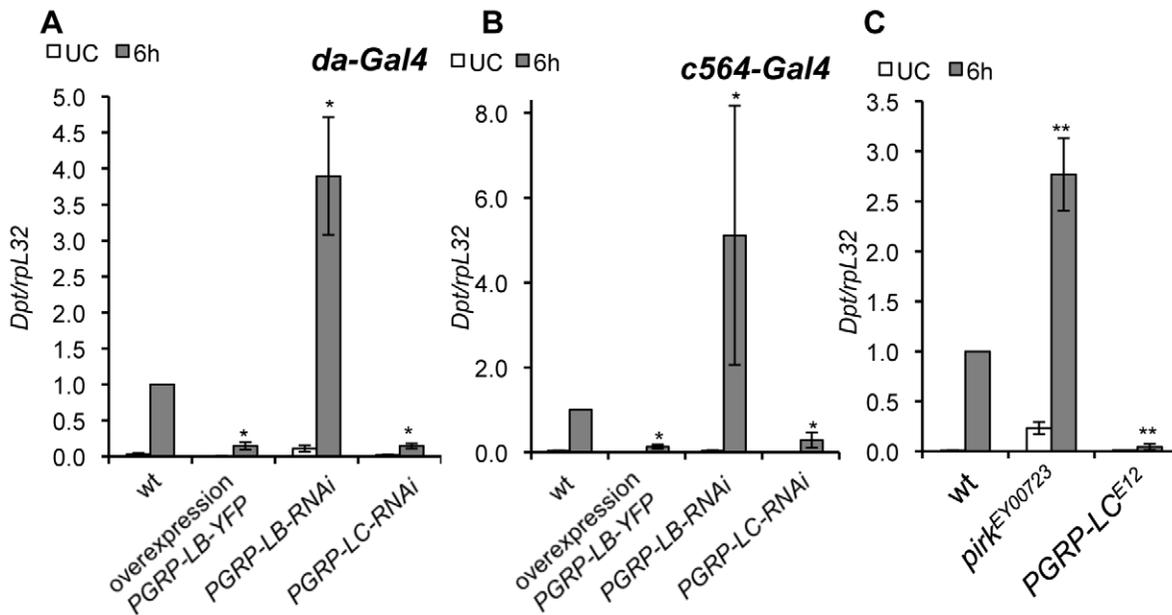


Figure 6. Pirk and PGRP-LB downregulate the immune response to genital infection. (A,B) Expression of *Dpt* in whole flies either unchallenged (UC) or 6h after genital deposition of TCT. Induction in control flies is compared to that in flies subjected to RNAi of *PGRP-LB* or *PGRP-LC* or overexpression of *PGRP-LB*, under the ubiquitous *da-Gal4* driver (A) or the tissue-specific fat body and haemocyte driver *c564-Gal4* (B). Similar results were obtained with two independent insertions of the *PGRP-LB* RNAi construct (R3 shown; R1 not shown). (C) Expression of *Dpt* in whole flies 6h after GI with *Ecc15*. Induction in control (Or) flies is compared to that in flies mutant for *pirk* (*pims^{EY00723}*) or *PGRP-LC* (*PGRP-LC^{E12}*). The *Dpt/rpL32* ratio is shown normalised to expression in GI wild-type flies (progeny of *da-Gal4* crossed to *w¹¹¹⁸* in A, progeny of *c564-Gal4* crossed to *w¹¹¹⁸* in B, Oregon in C). Statistical significance was determined by the Mann-Whitney U test where appropriate (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$). Data are the mean of 4 repeats and error bars are standard errors. doi:10.1371/journal.ppat.1000694.g006

We conclude that the activity of the Imd pathway is required in the haemolymph for a systemic response to genital infection and that this is blocked by the presence of a PGN degrading enzyme. As was shown for the gut immune response, the immune response to GI is tightly regulated, being limited by the Imd pathway modulators *PGRP-LB* and *Pirk*.

Radiolabelled TCT deposited on the genitalia enters the haemolymph

To strengthen the model that translocation of TCT into the haemolymph is responsible for the systemic immune response to genital deposition of PGN or TCT, we analysed whether traces of TCT could be detected in the haemolymph following its deposition on the genital plate. To this end, we deposited [¹⁴C]-radiolabelled TCT on the genital plate of males and tested for the presence of radioactivity in the haemolymph. Around 30nL of TCT was deposited on the genitalia of 100 flies and haemolymph samples were carefully collected 2h later (shortly after the systemic immune response is first detected) and deposited on a filter paper. Figure 5D shows that a radioactive signal could be detected in the haemolymph and Figure 5E indicates that about 1/1000th of the radioactivity deposited on the genitalia was recovered in the haemolymph 2h later. This is consistent with the observation that injection of 1 μ mol.L⁻¹ TCT provokes a similar level of systemic immune response to genital deposition of 1mmol.L⁻¹ TCT (Figure S4). RT-qPCR analysis revealed that *Diptericin* was expressed to similar levels in flies challenged with radioactive or non-radioactive TCT (data not shown). Since the [¹⁴C]-TCT used was radiolabelled at the level of the DAP, this experiment shows that [¹⁴C]-TCT or fragments of TCT containing the DAP are indeed translocated from the genital plate to the haemolymph.

Discussion

In this paper, we show that the deposition of bacteria on genitalia is sufficient to trigger both local and systemic expression of AMP genes in *Drosophila* males. Of all the sites where bacteria were deposited, the immune response was the greatest in the case of the genitalia. This demonstrates an unexpected immune reactivity to the presence of bacteria on the genitalia, that probably relates to the possibility of pathogen entry via this route. Exploiting this new mode of infection, we also provide strong evidence that a systemic immune response can be activated at a distance by the presence of bacteria on the genitalia, through the diffusion of small fragments of PGN. Thus our study not only provides information on the mechanisms used to prevent microbial infection of the genital tract, but also describes a novel mode of infection, via the genitalia, which offers new opportunities for the study of the long-range activation of *Drosophila* immunity.

Although the integument constitutes a formidable barrier with the outside world, there are weak points in the surface that parasites and pathogens might be expected to target, such as the gut, trachea and reproductive organs [25]. Thus the genital plate, with openings to the gut and genital tract, seems a likely route of pathogen entry [26]. The convolutions of the cuticular structures of the genital plate may facilitate the persistence of bacteria at this site, reducing the efficiency of cleaning by leg brushing, a typical grooming behaviour of the fly. This is corroborated by our observation that bacteria deposited on this structure persist longer than those deposited elsewhere on the cuticle. We observed that deposition of Gram-negative bacteria on the genital plate is sufficient to induce AMP gene expression locally in both the genital tract and hindgut. Due to the proximity between anal and genital openings, it was not possible to distinguish whether GI

results in infection of the genital tract, anus or both. However, since we observe that deposition of bacteria triggers stronger expression of AMP genes in the genital tract than in the gut, the genital tract could well be the main site of infection. Our study reveals for the first time that *Defensin*, an antibacterial peptide with activity against Gram-positive bacteria, is strongly induced in the genital tract upon GI with a Gram-negative bacterium, under control of the Imd pathway. Expression of the analogous vertebrate *Defensins* has also been reported in the reproductive tract and seminal fluid of male Rats, Mice and Humans, where it is proposed to play a role in the protection of germ cells [27].

Whereas we observed no significant immune response to bacterial deposition on the genitalia of female *Drosophila*, mating has been shown to stimulate the expression of AMP genes in females, as a result of accessory gland proteins present in the male seminal fluid [16]. These results support the theory that mating is a significant cause of infection for *Drosophila* in the wild [26]. In Insects generally, a wide range of infections have been shown to be transmitted during copulation [28] and potential pathogenic bacteria have been reported on male sexual organs [29]. In *Drosophila*, transfer of the entomopathogenic bacterium *Serratia marcescens* from contaminated males to females during courtship and mating has been observed in an experimental setting [30]. Our observations showing a high immune response to the presence of bacteria on the male genitalia suggest that the genital tract provides an entry route for bacteria in both sexes. It is intriguing that the two sexes seem to show immune responses to different genital stimuli. Immune differences between the sexes are commonly observed in Insects [31,32] and it has been suggested that in some cases this is an efficiency measure since infections are more reliably coupled to mating in females than males [26]. This is taken to the extreme in the bedbug, *Cimex lectularius*, where the female has a specific immune organ developed in response to traumatic insemination [26]. Although traumatic insemination has not been reported in *Drosophila melanogaster*, the male is known to inflict genital wounds during mating [17], thus infection may be reliably coupled to mating, leading to the evolution of an immune response to copulation. That males show a direct response to bacteria on the genitalia, rather than to copulation, could be explained by a reduced risk of infection associated with mating in males and an advantage to maintaining clean genitalia, thereby avoiding transmission of bacteria to mated females.

To date, two methods, septic injury and oral ingestion of certain bacterial strains, have been shown to activate systemic expression of AMP genes in *Drosophila* in response to bacterial infection. In this study, we report a third mode of activation of the systemic immune response by showing that deposition of bacteria on the male genital plate results in an immune response in the fat body, without the presence of bacteria in the haemolymph. This shows that the genitalia allow the passage of 'early-warning' signals that recruit and activate haemolymph-based effector systems (see below). As has been observed for oral infections [8,13], the immune response to GI is mediated by the Imd pathway and activated by DAP-type PGN of Gram-negative bacteria. The observation that DAP-type PGN of the Gram-positive *B. subtilis* is a less potent inducer might be explained by the absence of TCT and/or the high proportion of amidated DAP in *Bacillus* PGN. Interestingly, systemic *Diptericin* expression was observed in only 20% of GI treated males, all of these exhibiting a strong fat body expression. This suggests the existence of a threshold, with an all or nothing response. This clearly contrasts with the uniform immune response following septic injury. This threshold response is probably linked to the existence of multiple negative feedback controls such as PGRP-LB and Pirk, that regulate the Imd

pathway and prevent its activation. We can further speculate that the threshold response depends upon the ability of bacteria to colonise the genital tract. An important barrier role of the immune response to genital infection is demonstrated by our observations that the haemocoel of *Relish^{E20}*, but not wild-type, flies can be colonised by genitally deposited *Ecc15* and that *Relish^{E20}* flies exhibit significantly higher lethality than wild-type flies upon GI with a strain of the opportunistic bacterium *P. aeruginosa*.

Although much progress has been made in our understanding of the regulation of innate immunity, it remains to be determined how microbe-derived molecules activate the immune system under physiological conditions. In other systems small mucopeptide fragments of PGN, notably TCT, have been shown to act as diffusible signalling molecules. For example, TCT released by the symbiont *Vibrio fischeri* is involved in the differentiation of the light organ of the squid *Euprymna scolopes* [33]. Small mucopeptides were also identified as products of the intestinal flora that induce the genesis of lymphoid follicles in the gut of Mice, through activation of the Nod1 pathway [34]. Although the intracellular receptors Nod1 and Nod2 are known to be activated by small PGN fragments, how these ligands reach the intracellular compartment is unclear. Some progress has been made recently, with the identification of a transmembrane receptor, Pept1, as a possible transporter of the Nod2 ligand, muramyl dipeptide [35]. Alternately, another recent study reports that the clathrin and dynamin dependent endocytosis pathway is a key component in the activation of the Nod2 pathway [36].

We have previously suggested a model whereby long-range activation of the systemic immune response in *Drosophila* is mediated by the translocation of small PGN fragments from the gut lumen to the haemolymph [15]. This view was supported by the observation that ingestion of monomeric PGN can stimulate a strong systemic immune response in *PGRP-LB* RNAi flies, which have reduced amidase activity and are unable to degrade PGN to its non-immunogenic form. Our present study of GI further supports this model of long-range activation of the immune system by PGN translocation. Deposition of PGN or TCT on the genitalia is sufficient to induce a systemic immune response and, in agreement with a model that involves transport of PGN, we observed that TCT activates a stronger systemic immune response than polymeric PGN. That the systemic immune response to GI requires PGRP-LC expression in the fat body, and is suppressed by amidase activity in the haemolymph, suggests that this response is mediated by PGN fragments present in the haemolymph. Finally, GI with radiolabelled TCT has allowed us to show for the first time that TCT (or a fragment thereof) can be found in the haemolymph shortly after genital deposition and that its presence correlates with the activation of an immune response. It seems likely that the detected molecules are intact TCT, since fragments of TCT are insufficient for immune activation via PGRP-LC [5]. These results demonstrate that TCT is indeed translocated into the haemolymph, although do not exclude that other signalling mechanisms contribute to the systemic immune response to local infections.

Although TCT has been shown to be a diffusible signalling molecule in other systems, few studies have addressed the extent to which the gut and genital epithelial barriers are permeable in *Drosophila*. Interestingly, some of the male-derived Accessory Gland Proteins, transferred to the female reproductive tract during mating, access presumptive target tissues bathed by the haemolymph [37]. Further, some have been shown to directly traverse the female reproductive tract and enter the haemolymph by crossing the ventral intima of the posterior vaginal wall [38]. In spite of this apparent permeability, PGN applied to the genitalia of

females does not activate an immune response, underlining the difference between the genital tracts of male and female *Drosophila*. It remains possible that PGN fragments are translocated into the haemolymph by endocytosis or by specific transporters as has been suggested for ligands of the Nod2 pathway. Future work should decipher the mechanism, passive or active, of PGN translocation as well as the site of translocation. By contrast to oral infection, which depends upon the complex physiological regulation of feeding, GI is easy to control, since bacteria or PGN are applied directly to the genitalia. Thus GI provides a simple and reproducible mode of infection for further study of the long-range activation of the systemic immune response.

Materials and Methods

Fly stocks

Oregon^R flies were used as wild-type controls unless otherwise indicated. *Relish^{E20}* (*e⁺*, *Rel^{E20}*), *PGRP-LC^{E12}* and *pirk* (*pims^{EY00723}*) are described elsewhere [23,39,40]. *Gal^{m1}* is a null mutation in the β -galactosidase gene of *Drosophila* [41]. The *Gal4* lines used in this study specifically express GAL4 constitutively (*da-Gal4*) or in adult fat body and haemocytes (*c564-Gal4*) [42,43]. *Defensin-GFP*, *Cecropin A-GFP* and *Diptericin-lacZ* strains were described previously [44].

The *UAS-PGRP-LB-IR* (insertion R1 and R3) and *UAS-PGRP-LC-IR1* inverted repeat RNAi stocks were generated by Ryu Ueda and are described elsewhere [15]. A full-length cDNA of *PGRP-LB* (using the *CG31217_cDNA* gold LD43740 from DGRC) was placed downstream of the UAS sequence using the pUAST vector. The *UAS-PGRP-LB-YFP* transgene was obtained by a fusion of YFP to the C-terminus of PGRP-LB inserted in the pDONR221 Gateway entry clone (Invitrogen) and finally subcloned in the pTWG transgenesis vector. RNAi and overexpression experiments were controlled by crossing the *Gal4* drivers to *w¹¹¹⁸*, the strain in which the UAS construct insertions were generated. F1 progeny carrying both the *UAS* construct and the *Gal4* driver were transferred to 29°C at late pupal stage for optimal efficiency of the UAS/*Gal4* system. *Drosophila* stocks and crosses were maintained at 25°C in yeast tubes containing corn-meal fly medium [44].

Bacterial stocks

All bacteria were stored as frozen stocks (15% DMSO) and cultured on LB-Agar plates and in LB medium. *Ecc15* and *Ecc15-GFP* strains are Rifampycin resistant and were described previously [13]. They were grown overnight at 29°C (without selection) and used as pellets of OD₆₀₀ = 200 and 250 respectively [44]. The *Pseudomonas aeruginosa* strain 2466 (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, France) was used for survival experiments. It was grown at 37°C overnight and used as pellets of OD₆₀₀ = 150–200. Additional bacteria, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas entomophila* [19] and *Micrococcus luteus*, were grown at 29°C and used as pellets of OD₆₀₀ = 200. Pellets were not washed prior to use. Dead bacteria were produced by heating for 5 minutes at 95°C.

Infection and survival experiments

Septic injuries were performed by pricking adults in the thorax with a thin needle dipped into a concentrated bacterial pellet [44]. For Figure 2A, bacterial depositions were performed using a paintbrush dipped into a bacterial pellet. For all other experiments, GI was performed by touching a 200 μ L pipette-tip containing 10 μ L of bacterial pellet or 5 μ L of PGN/TCT to the tip of the abdomen, thereby depositing a small droplet (20–50nL) covering the whole genital plate (see Figure 1B). Infected males

were subsequently maintained at 29°C in tubes without yeast in the absence of females. In the case of the experiment using [¹⁴C]-TCT, each fly was maintained in a separate vial to prevent cross-contamination. For each bacterial strain, four independent survival experiments were performed with at least 20 flies per genotype, in replicates of 10–20 flies. Survival was scored every 24h.

RT-qPCR

AMP and *rpL32* mRNA quantification by RT-qPCR was performed as described [44]. All expression data are given as a ratio of the expression level of the invariant mRNA *rpL32*. Each experiment was performed with approximately 20 flies for each genotype.

Imaging

For GFP observation, flies were dissected in PBS and either directly observed under a Leica MZ16F dissecting microscope, or mounted in PBS for imaging with a Zeiss Axioimager Z1. β -galactosidase was visualised by X-gal staining, as previously described [44], followed by mounting in a 50:50 mix of ethanol and glycerol. Images were captured with a Leica DFC300FX camera and Leica Application Suite or with an AxioCam MRn camera and Axiovision respectively.

PGN and TCT

All PGN was prepared as described in Leulier et al, 2003 [4]. Each PGN was used at a monomer equivalent concentration of 5mmol.L⁻¹. For production of TCT, *E. coli* PGN was purified from the BW25113 Δ *lpp*::Cm^R strain that does not express the Braun lipoprotein and digested by SltY lytic transglycosylase [5]. Radiolabelled *E. coli* PGN was obtained by incorporation of *meso*-[¹⁴C] DAP (11.6 kBq.nmol⁻¹) into the FB8 *lysA::kan* strain grown in M63 minimal medium supplemented with 0.2% glucose and 100 μ g.ml⁻¹ of lysine, threonine and methionine [45]. Radiolabelled [¹⁴C]-TCT, produced by digestion of the resulting material with SltY, was purified by HPLC and its specific activity was estimated as 2kBq.nmol⁻¹. Both TCT and [¹⁴C]-TCT were used at a concentration of 1mmol.L⁻¹.

Haemolymph extraction

Haemolymph was extracted manually using a Nanodrop microinjector (NanojectTM) [44]. A glass needle containing approximately 100nL of protease inhibitors (1 \times Complete Mini, Roche, in PBS) was used to prick the flies in the dorsal thorax, inject 25nL of the inhibitor and immediately extract as much haemolymph as possible (through the same wound). For the experiment to detect [¹⁴C]-TCT, the dorsal thorax was washed, prior to haemolymph extraction, with a filter paper dipped in water to avoid contamination by [¹⁴C]-TCT potentially present on the cuticle. For each fly, the extracted haemolymph (and remaining protease inhibitor) was deposited on a filter paper, accumulating the haemolymph from 100 flies on the same paper. For the experiment to detect the presence of bacteria in the haemolymph, contamination between flies was avoided by washing the needle between each extraction first with one aliquot of protease inhibitor, followed by ethanol and a second, clean, aliquot of inhibitor, before refilling with a third aliquot of inhibitor.

[¹⁴C]-TCT quantification

Haemolymph extracts or 1 μ L drops of a dilution series of the [¹⁴C]-TCT solution were deposited on Whatman filter paper,

which was then exposed to a Phosphor Imager Screen (GE Healthcare) for 2 weeks at room temperature. Images were generated with a Typhoon Trio Phosphor Imager (GE Healthcare) and quantified with ImageQuant TL.

Elicitor injection

PGN, TCT and water were injected using a Nanodrop microinjector (NanodropTM) [44]. Flies were pricked in the thorax with a glass needle containing the elicitor solution and 13nL was injected.

Accession numbers

The Flybase (<http://www.flybase.org>) accession numbers for genes mentioned in this study are:

Attacin A (CG10146), *Cecropin A* (CG1365), *Defensin* (CG1385), *Diptericin* (CG12763), *Drosocin* (CG10816), *Drosomyacin* (CG10816), *Gal* (CG9092), *Metchnikowin* (CG8175), *PGRP-LB* (CG14704), *PGRP-LC* (CG4432), *Pirk* (CG15678) and *Relish* (CG11992).

Supporting Information

Figure S1 AMPs belonging to all families are specifically induced by Gram-negative bacteria upon genital infection. Expression profile of *Attacin A* (*Atta*), *Drosocin* (*Drc*), *Metchnikowin* (*Mtk*), *Cecropin A* (*CecA*), *Defensin* (*Def*) and *Drosomyacin* (*Drs*) in flies collected 18h after GI with various bacteria: *M.lut.*: *M. luteus*, *B.sub.*: *B. subtilis*, *Ecc15*: *E. carotovora*. Data are the mean of 4 repeats, error bars are standard errors.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000694.s001 (0.20 MB TIF)

Figure S2 Immune response to genital infections is also observed in unmated males. RT-qPCR analysis of *Dpt* expression in unmated or mated wild-type male flies collected 6h after GI infection with *Ecc15*. Males were collected a few hours after eclosion and left for 3 days either in the absence or presence of females, prior to infection. *Dpt/tpL32* ratios are shown normalised to expression 6h after GI in mated flies. Data are the mean of 3 repeats and error bars show standard error. UC - Unchallenged.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000694.s002 (0.04 MB TIF)

References

- Imler JL, Bulet P (2005) Antimicrobial peptides in Drosophila: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy* 86: 1–21.
- Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25: 697–743.
- Aggarwal K, Silverman N (2008) Positive and negative regulation of the Drosophila immune response. *BMB Rep* 41: 267–277.
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, et al. (2003) The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* 4: 478–484.
- Stenbak CR, Ryu JH, Leulier F, Pili-Floury S, Parquet C, et al. (2004) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the Drosophila immune deficiency pathway. *J Immunol* 173: 7339–7348.
- Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, et al. (2004) Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the Drosophila IMD pathway. *Immunity* 20: 637–649.
- Ferrandon D, Jung AC, Criqui M, Lemaitre B, Uttenweiler-Joseph S, et al. (1998) A drosomyacin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in Drosophila that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J* 17: 1217–1227.
- Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, et al. (2000) Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13: 737–748.
- Uvell H, Engstrom Y (2007) A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet* 23: 342–349.
- Charlet M, Lagueux M, Reichhart J, Hoffmann D, Braun A, et al. (1996) Cloning of the gene encoding the antibacterial peptide drosocin involved in Drosophila immunity. Expression studies during the immune response. *Eur J Biochem* 241: 699–706.
- Roos E, Bjorklund G, Engstrom Y (1998) In vivo regulation of tissue-specific and LPS-inducible expression of the Drosophila Cecropin genes. *Insect Mol Biol* 7: 51–62.
- Ryu JH, Nam KB, Oh CT, Nam HJ, Kim SH, et al. (2004) The homeobox gene Caudal regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila epithelia. *Mol Cell Biol* 24: 172–185.
- Basset A, Khush R, Braun A, Gardan L, Boccard F, et al. (2000) The phytopathogenic bacteria, *Erwinia carotovora*, infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3376–3381.
- Onfelt Tingvall T, Roos E, Engstrom Y (2001) The imd gene is required for local Cecropin expression in Drosophila barrier epithelia. *EMBO Rep* 2: 239–243.
- Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, et al. (2006) The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* 24: 463–473.
- Peng J, Zipperlen P, Kubli E (2005) Drosophila sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr Biol* 15: 1690–1694.
- Kamimura Y (2007) Twin intromittent organs of Drosophila for traumatic insemination. *Biol Lett* 3: 401–404.
- Lemaitre B, Reichhart J, Hoffmann J (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14614–14619.
- Vodovar N, Vinals M, Liehl P, Basset A, Degraud J, et al. (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11414–11419.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32: 259–286.
- Bischoff V, Vignal C, Duvic B, Boneca IG, Hoffmann JA, et al. (2006) Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by Peptidoglycan-Recognition Proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog* 2: e14. doi:10.1371/journal.ppat.0020014.

Figure S3 Local expression of *Defensin* and *Diptericin*, upon genital infection, is controlled by the Imd pathway. RT-qPCR analysis of *Dpt* and *Def* expression in the genital tract of wild-type (Or, white bars) and *Relish^{E20}* (*Rel*, black bars) flies, 6h after deposition of TCT on the genital plate. Data are the mean of 3 repeats and error bars show standard error. UC - Unchallenged. Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000694.s003 (0.08 MB TIF)

Figure S4 Similar *Diptericin* expression is induced by genital deposition of TCT or injection of 1/1000th dilution of TCT. RT-qPCR analysis of *Dpt* expression in wild-type flies 6h after injection or deposition on the genital plate (genital) of TCT or PGN. For the injection, flies were challenged with 1/10th to 1/10000th serial dilutions of the solutions of TCT and PGN used for genital challenge (initial concentrations 5mmol.L⁻¹ for PGN and 1mmol.L⁻¹ for TCT). 1/10th–1/1000th dilutions of PGN all elicited similar levels of *Dpt* expression upon injection, suggesting that they are saturating the immune response. *AMP/tpL32* ratios are shown normalised to expression 6h after genital challenge with TCT. Data are the mean of 3 repeats and error bars show standard error. UC - Unchallenged, ND - not determined.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000694.s004 (0.10 MB TIF)

Acknowledgments

We thank François Leulier, Nicolas Buchon, Ryu Ueda (National Institute of Genetics, Mishima) and the Bloomington Center for fly stocks, Dominique Mengin-Lecreulx for provision of PGN reagents, Armand Valsesia, Jacques Rougemont and Grégory Lefebvre for help with statistics and D.M.-L., Marie Meister and Onya Oputa for critical reading of the manuscript. We also thank S. Jagadeeshan and R. Singh for providing us with the image shown in Figure 1A and our colleague Lionel Mury for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG DPW BL. Performed the experiments: MG DPW. Analyzed the data: MG DPW BL. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP MH. Wrote the paper: MG DPW BL.

22. Kleino A, Myllymaki H, Kallio J, Vanha-aho LM, Oksanen K, et al. (2008) Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. *J Immunol* 180: 5413–5422.
23. Lhocine N, Ribeiro PS, Buchon N, Wepf A, Wilson R, et al. (2008) PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe* 4: 147–158.
24. Aggarwal K, Rus F, Vriesema-Magnuson C, Erturk-Hasdemir D, Paquette N, et al. (2008) Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS Pathog* 4: e1000120. doi:10.1371/journal.ppat.1000120.
25. Siva-Jothy M, Moret Y, Rolff J (2005) Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. *Advances in Insect Physiology* 32.
26. Siva-Jothy M (2009) Reproductive Immunity. In: Rolff J, Reynolds S, eds. *Insect Infection and Immunity* Oxford University Press.
27. Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Collet D, et al. (2003) Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol Reprod* 68: 95–104.
28. Knell RJ, Webberley KM (2004) Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79: 557–581.
29. Reinhardt K, Naylor R, Siva-Jothy MT (2005) Potential sexual transmission of environmental microbes in a traumatically inseminating insect. *Ecological Entomology* 30: 607–611.
30. Miest TS, Bloch-Qazi MC (2008) Sick of mating: Sexual transmission of a pathogenic bacterium in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* 2.
31. Rolff J, Siva-Jothy MT (2002) Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9916–9918.
32. Numm CL, Lindenfors P, Pursall ER, Rolff J (2009) On sexual dimorphism in immune function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 61–69.
33. Koropatnick TA, Engle JT, Apicella MA, Stabb EV, Goldman WE, et al. (2004) Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science* 306: 1186–1188.
34. Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, et al. (2008) Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456: 507–510.
35. Ismail MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreux D, et al. (2006) hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 1313–1319.
36. Marina-Garcia N, Franchi L, Kim YG, Hu Y, Smith DE, et al. (2009) Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J Immunol* 182: 4321–4327.
37. Ortiger M, Soller M, Stocker RF, Kubli E (2000) Binding sites of *Drosophila melanogaster* sex peptide pheromones. *J Neurobiol* 44: 57–71.
38. Lung O, Wolfner MF (1999) *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system of the mated female fly by crossing the posterior vaginal wall. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 1043–1052.
39. Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, et al. (1999) Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell* 4: 827–837.
40. Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, et al. (2002) The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416: 640–644.
41. Knipple DC, MacIntyre RJ (1984) Cytogenic mapping and isolation of mutations of the beta-Gal-1 locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 198: 75–83.
42. Giebel B, Stuttem I, Hinz U, Campos-Ortega JA (1997) Lethal of scute requires overexpression of daughterless to elicit ectopic neuronal development during embryogenesis in *Drosophila*. *Mech Dev* 63: 75–87.
43. Hrdlicka L, Gibson M, Kiger A, Michelli C, Schober M, et al. (2002) Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* 34: 51–57.
44. Romeo Y, Lemaitre B (2008) *Drosophila* immunity: methods for monitoring the activity of toll and imd signaling pathways. *Methods Mol Biol* 415: 379–394.
45. Mengin-Lecreux D, Siegel E, van Heijenoort J (1989) Variations in UDP-N-acetylglucosamine and UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide pools in *Escherichia coli* after inhibition of protein synthesis. *J Bacteriol* 171: 3282–3287.
46. Jagadeeshan S, Singh RS (2006) A time-sequence functional analysis of mating behaviour and genital coupling in *Drosophila*: role of cryptic female choice and male sex-drive in the evolution of male genitalia. *J Evol Biol* 19: 1058–1070.

C. Mechanisms underlying peptidoglycan diffusion upon genital infections

The results presented in the paper strongly suggest that peptidoglycan fragments can diffuse through the epithelium and induce an immune response remote from the site of infection in the body cavity. They raise the question of how peptidoglycan is translocated into the body cavity. In Vertebrates, the main innate immune receptors for peptidoglycan are NOD1 and NOD2, which recognize different types of muropeptides. These receptors are both intracellular; thus the sensing of peptidoglycan required its internalisation into the cell. The precise mechanisms of internalisation of the muropeptides are still controversial and two hypotheses have been proposed. On the one hand, NOD2 ligand, the muramyl-dipeptide, would be transferred through the plasma membrane by the transporter Pept1 (Ismair et al., 2006). On the other hand, the internalisation of muramyl-dipeptide would be mediated by clathrin and dynamin-dependent endocytosis (Marina Garcia et al., 2009). Both mechanisms could also be involved in peptidoglycan translocation through the epithelium in the fly. Indeed, *Drosophila* has a homologue of *Pept1*, *yin*, which is a putative oligopeptide transporter and clathrin/dynamin dependent endocytosis is also conserved in flies.

We decided to test both hypotheses in the male after genital infection. To this aim, we took an *in vivo* RNAi approach targeting *yin*, *clathrin* (heavy and light chains) and *dynammin*, specifically in the ejaculatory duct, using the DJ646-Gal4 driver (Bloomington #8169). We first confirmed the specificity of the driver by analysing the fluorescence in the male progeny of a DJ646-Gal4 x UAS-GFP2 cross. Moreover, all RNAi transgenes used in this experiment are inserted at the same locus, using a ϕ C31 integration system, which has been shown to confer a good specificity of expression (Ni et al., 2008).

We observed a striking reduction of systemic *Diptericin* expression upon genital infection with *Ecc15* in flies expressing an RNAi construct targeting either *clathrin* or *dynammin* but no effect when *yin* was knocked down. Consistently, we also observed a reduction of *Diptericin* induction upon expression of *shibire^{ts1}*, a dominant negative mutant of dynammin, in the ejaculatory duct. Together, our results favor the hypothesis of a translocation of peptidoglycan by transcytosis.

Interestingly, we did not observe any reduction in *Diptericin* expression when *clathrin* or *dynammin* were silenced in the haemocytes using the *hml-Gal4* driver. Thus, if the peptidoglycan is translocated by transcytosis, the mechanism

probably does not require any endocytosis in the haemocytes. Consistently, we observed that the response to genital infection was not impaired in phago^{less} flies, in which haemocytes have been depleted by transgene induced apoptosis (unpublished results).

We chose to present these very preliminary results because of their consistency and the fact that they involved different knock downs of several genes. Nevertheless, they derive from one single experiment and we did not control the efficiency of the RNAi of each gene. Thus, they still need to be repeated. Moreover, as clathrin/dynamin mediated endocytosis is involved in many processes, further experiments are needed to determine if this mechanism is directly or indirectly linked with the immune response to genital infection.

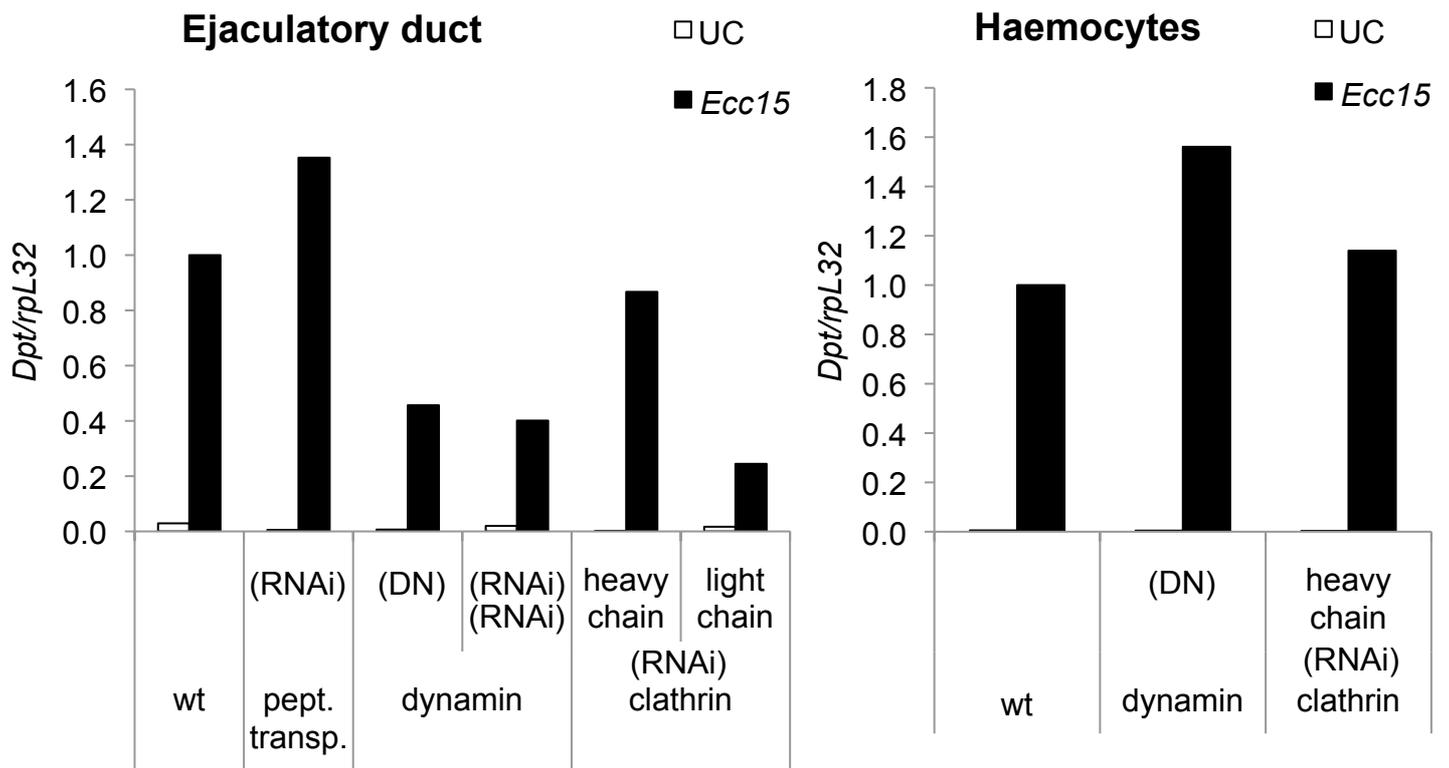


Figure 11: Analysis of the way of translocation of the peptidoglycan upon genital infection
 RT-qPCR analysis of *Dpt* expression upon genital infection after inactivation of *yin* oligopeptide transporter (pept. transp.), clathrin (light and heavy chains) and dynamamin. Inactivation was performed specifically in the ejaculatory duct (A) and in the haemocytes (B) either by RNAi or by expression of a dominant negative form of the dynamamin (DN). *Dpt* expression is reported to the level of expression after infection in the wt. Data show one single experiment.

II. Caractérisation de la fonction de PGRP-LA

A. Introduction

Les PeptidoGlycan Recognition Proteins (PGRP) ont des fonctions diverses dans l'immunité de la Drosophile. Ils sont notamment impliqués dans la régulation positive et négative des voies Toll et Imd lors d'infections bactériennes. Certains, comme PGRP-LC, sont des récepteurs liant le peptidoglycane et induisant une réponse à l'infection, alors que d'autres, tels que PGRP-LB, sont des régulateurs impliqués dans des boucles de rétroaction négative, et dégradent le peptidoglycane en fragments non immunogènes. Enfin, des études *in vitro* suggèrent que PGRP-SB est un effecteur antibactérien. Les PGRP qui ont été caractérisés jusqu'à présent semblent donc intervenir dans la réponse immunitaire induite par les infections bactériennes. La fonction de certains PGRP reste cependant inconnue : c'est le cas de PGRP-LD et de PGRP-LA.

Mon deuxième projet de thèse vise à caractériser la fonction de PGRP-LA. Les résultats de mes recherches, présentés dans le manuscrit qui suit, suggèrent que PGRP-LA est impliqué dans l'induction d'une immunité basale dans les trachées, en absence d'infection. Ce manuscrit n'a pas encore été publié, et une partie des résultats qu'il présente doivent encore être validés avant de pouvoir l'envoyer à publication. Des résultats présentés subséquentement suggèrent que PGRP-LA serait impliqué dans l'induction d'une réponse dans le corps gras au contact des glandes salivaires.

B. Manuscrit : PGRP-LA promotes basal antibacterial defense in *Drosophila* barrier epithelia

Mathilde Gendrin, Anna Zaidman-Rémy, Mickaël Poidevin and Bruno Lemaitre

PGRP-LA promotes basal antibacterial defense in *Drosophila* barrier epithelia

Mathilde Gendrin^{1,2}, Anna Zaidman-Rémy², Mickael Poidevin² and Bruno Lemaitre^{1,2}

¹ Global Health Institute, Ecole Polytechnique Fédérale Lausanne (EPFL), CH-1015 Lausanne, Switzerland

² Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Corresponding author:

Bruno Lemaitre, Global Health Institute, EPFL, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Email: bruno.lemaitre@epfl.ch

Running title: Functional analysis of PGRP-LA during *Drosophila* immune response

Abstract

The Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) are involved in several immune processes in Metazoans: some have been shown to induce or repress the immune response whilst others are antimicrobial effectors. PGRP-LA, an uncharacterized *Drosophila* PGRP, is encoded by a gene located in cluster with *PGRP-LC* and *PGRP-LF*, that encode two components of the Imd pathway. Here, we present an analysis of *PGRP-LA* function. We show that the expression antimicrobial peptide gene is not impaired in either the fat body or the midgut of *PGRP-LA* deficient flies. Focusing on the tracheal system, where PGRP-LA is strongly expressed we present a genome-wide analysis of gene expression in the trachea of wild-type larvae and of *Relish* or *PGRP-LA* mutants. Comparing our data to previous studies on whole adult flies and the adult gut, we report that many genes regulated in the trachea upon infection are specifically regulated in this tissue. In addition, we observed that antimicrobial peptide gene expression is reduced in the trachea of *PGRP-LA* deficient larvae, especially under unchallenged conditions. Thus, we propose that PGRP-LA is involved in the maintenance of a basal level of Imd pathway activity in the barrier epithelia where it is expressed.

Introduction

Drosophila, in contrast to mammals, lacks adaptive immunity and therefore relies entirely on innate mechanisms of immunity for defense against invading microorganisms (Ferrandon et al., 2004; Hultmark, 2003; Tzou et al., 2002b). In a manner similar to mammalian innate immunity, pathogens are recognized through the interaction of microbial compounds with Pattern-recognition receptors (PRRs). A major class of PRRs in Insects is the Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) that participate in the sensing of bacteria and regulate antibacterial defense. In *Drosophila*, the Toll and Imd pathways are two major signaling cascades regulating the massive expression of antimicrobial peptides (AMPs), and other immune genes, by the fat body, that occurs following a systemic infection (Lemaitre and Hoffmann, 2007). The Toll pathway is activated primarily by Gram-positive bacteria and fungi, and controls the expression of several genes, notably the antifungal peptide gene *Drosomycin*, while the Imd pathway is triggered mostly by Gram-negative and *Bacillus*-type Gram-positive bacteria and induces the expression of genes such as *Diptericin*, encoding an antibacterial peptide (Lemaitre et al., 1997). Activation of both pathways by bacteria is achieved through the sensing of specific forms of peptidoglycan (PGN) by PGRPs. PGN is an essential glycopeptidic polymer restricted to the cell wall of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. It consists of long glycan chains of alternating N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid residues. These chains are cross-linked to each other by short peptide bridges, which differ in the third residue in Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, with respectively a Lysine (Lys) and a meso-diaminopimelic acid (DAP) (Mengin-Lecreulx and Lemaitre, 2005) in this position. There is however a sub-class of Gram-positive bacteria including *Bacillus* and *Listeria* species which produce DAP-type PGN. Another major difference between Gram-negative and Gram-positive PGN is its localization within the cell wall. Gram-negative PGN forms a thin layer which is hidden in the periplasmic space underneath the outer membrane lipopolysaccharide (LPS) layer, whereas the PGN in Gram-positive bacteria constitutes a thick layer that is exposed at the bacterial surface. Studies using highly purified bacterial compounds have shown that the Imd pathway is activated by DAP-type PGN, while the Toll pathway is triggered by Lys-type PGN (Leulier et al., 2003). Further studies have shown that both polymeric and monomeric DAP-type PGN can activate the Imd pathway. A specific monomer, the GlcNAc-MurNAc(anhydro)-L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala, also known as tracheal cytotoxin (TCT), has been identified as

the minimal PGN motif capable of efficient induction of the Imd pathway (Kaneko et al., 2004; Stenbak et al., 2004).

PGRPs form a conserved family of proteins sharing a 160 amino acid domain (the PGRP domain) with similarities to bacteriophage T7 lysozyme, a zinc-dependent N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (NAMLAA) that removes peptides from the glycan chains of PGN (Dziarski and Gupta, 2006; Royet and Dziarski, 2007). The *Drosophila* genome encodes 13 PGRPs, some of which retain amidase properties. The PGRPs of this subgroup, referred to as catalytic PGRPs, have demonstrated (PGRP-SC1A/B, LB, SB1) or predicted (PGRP-SB2, SC2) zinc-dependent NAMLAA activity, which reduces or eliminates the ability of PGN to elicit an immune response (Kim et al., 2003; Mellroth et al., 2003; Mellroth and Steiner, 2006). It was recently shown that PGRP-SC1A/SC1B/SC2 and PGRP-LB modulate Imd pathway activity by scavenging PGN (Bischoff et al., 2006; Zaidman-Remy et al., 2006). The function of PGRP-SB has not yet been analyzed *in vivo* but it was proposed that this secreted PGRP could function as an antibacterial protein (Mellroth and Steiner, 2006). The non-catalytic PGRPs (PGRP-SA, SD, LA, LC, LD, LE, LF) lack the zinc-binding residues required for amidase activity but some of them retain the ability to bind and recognize PGN, and function as PRRs. PGRP-SA and PGRP-SD are secreted proteins circulating in the hemolymph that have been shown to activate the Toll pathway in response to the Lys-type PGN found in most Gram-positive bacteria (Bischoff et al., 2004; Michel et al., 2001). The transmembrane receptor PGRP-LC, which is activated by the DAP-type PGN of Gram-negative bacteria, is the main receptor upstream of the Imd pathway (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Kaneko et al., 2006; Ramet et al., 2002; Takehana et al., 2004). PGRP-LE is produced in both extracellular and intracellular forms and has been shown to participate in the sensing of DAP-type PGN containing bacteria in two different manners: the secreted form of PGRP-LE enhances the activation of PGRP-LC by PGN while the intracellular PGRP-LE directly activates the Imd pathway in response to intracellular TCT (without the involvement of PGRP-LC). Intracellular PGRP-LE has also been shown to promote autophagy against some bacteria, such as *Listeria monocytogenes*. PGRP-LF, encoded by a gene clustered with PGRP-LC, is a transmembrane protein with two PGRP domains. Studies have indicated that PGRP-LF inhibits the activation of PGRP-LC, in the absence of infection, either by sequestering peptidoglycan or by locking PGRP-LC in an inactive conformation. The functions of PGRP-LD and PGRP-LA are not yet known.

In this study, we report a functional analysis of PGRP-LA, a non-catalytic PGRP encoded by a gene of the PGRP-LC/LF cluster. Our data show that *PGRP-LA* is expressed in several barrier epithelia such as the hindgut and trachea and is modestly induced upon septic injury. Among the three isoforms of PGRP-LA, we show that the RHIM-containing PGRP-LA_D isoform is expressed in cytoplasmic dots and can activate the Imd pathway upon over-expression. Our structural analysis of the PGRP-LA sequence predicts that its PGRP domain, present in the isoforms PGRP-LA_C and LA_F, cannot by itself bind PGN. By P-element imprecise excision, we generated a mutation that removes most of the *PGRP-LA* sequence (*PGRP-LA*^{2A}). Whilst we did not detect any defect in the systemic immune response of *PGRP-LA*^{2A} flies, we observed that AMP production was impaired in the tracheae of *PGRP-LA*^{2A} larvae, particularly in unchallenged conditions. Finally, our study includes a genome-wide analysis of gene expression in the trachea in the presence or absence of *PGRP-LA* and *Relish*. Comparing this analysis with previous studies monitoring the fat body and gut response, we observed that in each case the pool of genes regulated upon infection is mostly tissue-specific. Altogether, our data suggest that *Drosophila* has evolved a novel fine-tuning function for PGRPs, in order to maintain a basal level of expression of AMPs, which could be important in the control of the flora and in the prevention of infection.

Results

***PGRP-LA* is expressed in barrier epithelia and is weakly up regulated in response to infection**

PGRP-LA is located at the 5' boundary of a cluster of three genes, containing also *PGRP-LC* and *PGRP-LF*. It encodes three isoforms, which are referred to here as PGRP-LA_D, LA_F and LA_C (see figure 1A), following Flybase nomenclature, but which were also called respectively PGRP-LAa, LAb and LAc in previous publications (Werner et al., 2000). RT-qPCR analysis shows that *PGRP-LA* is expressed at a basal level in all developmental stages of *Drosophila* and that the level of expression is highest in early pupae (Figure 2C), which is consistent with a previous Northern Blot analysis (Werner et al., 2000). Data from FlyAtlas reveal a stronger expression of *PGRP-LA* in barrier epithelia, especially in salivary glands and trachea of larvae and in the hindgut of adults (Figure 2A) (Chintapalli et al., 2007). Surprisingly, *PGRP-LA* reaches its

maximum level of expression in the adult eye, an organ not usually associated with the immune response. RT-qPCR with PGRP-LA_D or PGRP-LA_{C/F} specific primers shows a similar distribution of these isoforms in all the tissues tested except in Malpighian tubules where PGRP-LA_C and _F were absent (Figure 2B). Finally, we confirmed that the gene *PGRP-LA* is induced 2-fold in both males and females upon septic injury with either *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) or *Escherichia coli* (*E. coli*) (Figure 2D and data not shown).

Overexpression of *PGRP-LA_D* induces the Imd pathway

Sequence analysis predicted that the isoforms encoded by *PGRP-LA* differ considerably in their protein domain organizations. PGRP-LA_D encodes a putative transmembrane protein with an intracellular domain containing a RIP Homotypic Interaction Motif (RHIM) (Kaneko et al., 2006; Meylan et al., 2004) but lacking the PGRP domain. The RHIM domain is also found in PGRP-LC and PGRP-LE and has been shown to be necessary in these receptors for induction of the Imd pathway (Kaneko et al., 2006). PGRP-LA_F contains both a transmembrane domain and a PGRP domain, a structure reminiscent to that of the PGRP-LC receptor. PGRP-LA_C encodes a short protein of 138 amino acids composed exclusively of a PGRP domain with a truncated N-terminus. To investigate the sub-cellular localization and activity of each of the three isoforms, we generated constructs containing the coding sequence of each PGRP-LA isoform linked at the 3' end to the sequence of the *Yellow Fluorescent Protein* gene (YFP), under the control of a UAS promoter. Upon over-expression of each construct with the ubiquitous *da-Gal4* driver, we observed that PGRP-LA_F was located at the cell membrane, which is consistent with the presence of a transmembrane domain, whereas PGRP-LA_D was expressed in multiple dots around the nucleus, a staining reminiscent of the Golgi apparatus. Surprisingly, we observed fluorescence only in the ovary upon *da-Gal4*-driven over-expression of *PGRP-LA_C*.

Over-expression of PGRP-LE and PGRP-LC is sufficient to activate the Imd pathway, in agreement with their function upstream of this pathway (Gottar et al., 2002; Takehana et al., 2002). This prompted us to investigate the effect of the over-expression of PGRP-LA isoforms on the Imd pathway. Figure 3A shows that over-expression of PGRP-LA_D but not that of PGRP-LA_F or PGRP-LA_C induced a very high expression level of *Diptericin*, an antibacterial peptide gene regulated by the Imd pathway, in unchallenged flies. *Diptericin* induction by

PGRP-LA_D required Dredd and Tak1 but was independent of PGRP-LC (Figure 3B). The observation that PGRP-LA_D can activate the Imd pathway, its containing a RHIM domain and the location of PGRP-LA in the same cluster as PGRP-LC and LF are highly suggestive of an implication of PGRP-LA in the regulation of the Imd pathway.

PGRP-LA is dispensable for the induction of a systemic immune response

In order to investigate the role of PGRP-LA *in vivo*, we generated a *Drosophila* strain deficient for *PGRP-LA* by imprecise excision of the P-element G14937 (KAIST library) and screened by PCR for lines presenting a deletion uncovering the PGRP domain sequence. Of 30 lines tested, we found one, referred to as *PGRP-LA*^{2A}, bearing a deletion of 1401bp upstream of the P-element insertion site, which included the exons encoding the whole of the PGRP-LA_C and LA_F isoforms and the four last exons of the PGRP-LA_D isoform (Figure 1A). In agreement with the molecular characterization, we found that *PGRP-LA*^{2A} adults did not express *PGRP-LA* mRNA (the primers were chosen to amplify a region included in the deleted part of *PGRP-LA*). In addition, *PGRP-LA*^{2A} mutants were viable and fertile and did not show any apparent developmental defects as observed for the other PGRP mutant lines described so far. In order to reduce the probability of indirect genetic background effects, we introgressed *PGRP-LA*^{2A} into Canton^S by backcrossing *PGRP-LA*^{2A} males with Canton^S females for three generations.

The immune-inducibility of PGRP-LA suggested a function in the immune response. In order to clarify its role, we analyzed the effect of PGRP-LA inactivation on the systemic immune response induced upon injection of different classes of microorganisms into the hemolymph of PGRP-LA flies. Inactivation of PGRP-LA did not result in increased susceptibility to infection as determined by fly survival rates following injection of *Erwinia carotovora carotovora* 15 (Ecc15, OD 200 and 50), *Salmonella typhimurium* (OD 0.65 and 10⁻⁵), *L. monocytogenes* (OD 0.65 and 10⁻⁵), *Enterococcus faecalis* (OD5, 10, 15) or *C albicans* (OD200) whereas inhibition of the Imd pathway in a Relish mutant or the Toll pathway in a Spätzle (Spz) mutant had a dramatic effect upon survival (Figure 4E, F, G and data not shown). Consistent with this observation, Diptericin (Dpt) expression, a read-out of the Imd pathway, remained inducible in PGRP-LA^{2A} flies in response to Ecc15 infection (Figure 4A). We then tested if PGRP-LA was

involved in the sensing of the DAP-type peptidoglycan found in the gram-positive bacteria *L. monocytogenes*, where deacetylation of the glucan chain has been shown to reduce its immune detection (Boneca et al, 2007). Figure 4B shows that the level of *Diptericin* expression in *PGRP-LA*^{2A} mutants, in response to *L. monocytogenes* was similar to that observed in wild-type flies. In addition, a wild-type immune response was also observed when flies were injected with concentrated solutions of either Gram-negative polymeric peptidoglycan or TCT instead of live bacteria (Figure 4C). We next analyzed a possible effect of PGRP-LA on the Toll pathway by monitoring *Drs* expression after challenge by Gram-positive bacteria. As shown in Figure 4D, we did not observe any difference between the *Drosomycin* expression of *PGRP-LA*^{2A} mutants and wild-type flies after infection with *M. luteus*.

Collectively, our data indicate that PGRP-LA does not function as an essential PRR in either the Toll or the Imd pathway during the systemic immune response.

PGRP-LA does not synergize with PGRP-LC in the activation of the Imd pathway

PGRP-LC-deficient flies display a strongly reduced expression of antibacterial peptide genes in response to Gram-negative bacteria. This effect is similar to, albeit weaker than, that observed for *Imd*-deficient mutants (Gottar et al., 2002). This is explained by the synergistic role of PGRP-LE and PGRP-LC in the sensing of Gram-negative bacteria and *PGRP-LE*^{E12}; *PGRP-LC*^{E12} double mutants exhibit an increased susceptibility to Gram-negative bacterial infections compared to the *PGRP-LC*^{E12} single mutant (Takehana et al., 2004). We tested if, as described for PGRP-LE, PGRP-LA could enhance the activation of the Imd pathway by PGRP-LC. By FRT-mediated recombination, we generated a deletion that removes both PGRP-LC and PGRP-LA (Figure 1A) and used it to compare the residual level of Imd pathway activation in *PGRP-LC*^{E12} and in *PGRP-LC*, *PGRP-LA* double mutant (*PGRP-LALC*^Δ) (Figure 4A). *PGRP-LALC*^Δ flies exhibit the same degree of susceptibility to infection with *Ecc15* and *E. coli* as *PGRP-LC* deficient flies (Figure 4E, data not shown). Similarly, analysis of *Diptericin* expression does not reveal any difference in the level of expression between *PGRP-LC*^{E12} and *PGRP-LALC*^Δ flies (Figure 4A).

We conclude that PGRP-LA and PGRP-LC do not synergize in the activation of the Imd pathway. This observation, together with the fact that

PGRP-LA^{2A} deletion neither affects Imd pathway activation by TCT nor causes susceptibility to low doses of *L. monocytogenes* indicates a function for PGRP-LA distinct from that of PGRP-LE.

PGRP-LA is not required for the local activation of the Imd pathway in the gut

The use of Green fluorescent protein (GFP) reporter transgenes in *Drosophila* has revealed that, in addition to the fat body, AMP genes can be induced by the Imd pathway in several barrier epithelia which are potentially in contact with micro-organisms (Tzou et al., 2000). Upon oral infection, AMP expression was observed in the gut, mainly in the midgut. This observation prompted us to test a possible involvement of PGRP-LA in local AMP expression in the gut. Previous studies have shown that sensing of Gram-negative bacteria in the gut is mediated through the recognition of Gram-negative peptidoglycan by PGRP-LC (Zaidman-Remy et al., 2006). The use of reporter genes and RT-qPCR revealed that the *PGRP-LA* mutant expressed a wild-type level of *Diptericin* in the gut either in the absence of infection or after infection with *Ecc15* (data not shown). These observations are consistent with the observation that *PGRP-LA* is very weakly expressed in the midgut (Figure 2A) and rule out a specific function of PGRP-LA in the regulation of the Imd pathway in the midgut epithelium.

PGRP-LA does not participate in the long-range activation of the Imd pathway

Local accumulation of bacteria in the gut or in the genital tract can trigger a systemic response in the fat body, without any bacterial invasion of the hemolymph. This has been shown for several Gram-negative bacteria in the case of genital infections, and for a few specific Gram-negative bacterial species, such as *P. entomophila*, in the case of oral infections (Basset et al., 2000; Vodovar et al., 2005). The long-range activation of the Imd pathway has been proposed to be mediated by translocation of small PGN fragments through epithelia and thus it was studied using highly purified PGN and its derivatives (Gendrin et al., 2009; Zaidman-Remy et al., 2006). More precisely, it was observed that ingestion of monomeric PGN stimulates a strong systemic immune response in PGRP-LB

RNAi flies that are unable to degrade PGN to its non-immunogenic form (Zaidman-Remy et al., 2006). Moreover, radioactive TCT has been detected in the hemolymph after deposition on the genital plate of males (Gendrin et al., 2009). We hypothesized that PGRP-LA could participate in this process, acting for instance in the binding and translocation of PGN from one compartment to another. We tested this hypothesis in three different manners. We first assayed the systemic level of *Diptericin* expression in *PGRP-LA*^{2A} flies orally infected with *P. entomophila*. Second, we monitored the level of *Diptericin* in *PGRP-LB*¹², *PGRP-LA*^{2A} double mutant flies orally infected with *Ecc15*. Third, we analyzed the systemic level of *Diptericin* expression after deposition of bacteria on genitalia. Figure 5 shows that in the three conditions tested, the level of *Diptericin* expression induced in the fat body was not affected by the absence of PGRP-LA.

We conclude that PGRP-LA does not play an essential role in the long-activation of the Imd pathway.

PGRP-LA promotes basal AMP expression in the trachea.

In the absence of any overt immune function for PGRP-LA in the fat body and gut, we next explored its role in the trachea, a tissue in which *PGRP-LA* expression is enriched (Figure 2A) and up-regulated in response to infection (Wagner et al., 2009). As a first step, we investigated the tracheal immune response to Gram-negative bacteria which is still poorly described and, in a second step, we analyzed the impact of *PGRP-LA* mutation on this response.

Genome-wide analysis of the tracheal immune response

To determine the genes specifically induced in the tracheae, we investigated transcriptome variations in dissected tracheae (including anterior spiracles) of larvae infected with the Gram-negative bacteria *Ecc15*. We chose *Ecc15* as this bacterial strain strongly induces the Imd pathway in the trachea upon natural infection, as revealed by the induction of the *Drs* gene (Tzou et al., 2000; Wagner et al., 2009). Transcriptome data were generated using Affymetrix GeneChip Drosophila Genome 2.0 Array for wild-type, *Relish*^{E20} and *PGRP-LA*^{2A} third instar larvae growing on regular medium or medium contaminated with *Ecc15* during 24 hours. Our analysis identified 898 genes whose expression significantly varied in response to *Ecc15* infection in the wild-type strain. We focused our attention on the 225 genes that differ by at least a 2-fold change over

unchallenged including 120 induced and 105 repressed transcripts, 30% of which vary by more than 4-fold (Figure 6A; see Figure 6B for a selection of up-regulated genes and Supplementary Table 1 for complete data set). Using a global classification, more than half of the tracheae-regulated genes were assigned to six functional categories: antimicrobial defense, stress response, signaling, peptidases, general and chitin metabolism (Figure 6C). Moreover, our analysis revealed a large set of previously unidentified bacteria responsive genes which are specific to the trachea (Figure 6B). To determine the contribution of the Imd pathway to antimicrobial defense in the gut, we examined the effect of the *Relish* mutation on gene expression. The expression of 54 up-regulated genes and 20 down-regulated genes was altered at least 2-fold in a *Relish* background compared to wild-type (Figure 6A and Supplementary Table 1). A clear enrichment of Relish target genes was observed among the most strongly induced genes with immune function (Figure 6A). We found that a large fraction (19/24) of up-regulated genes with immune signatures and reported to be induced in the systemic or the gut immune responses were affected in the *Relish* mutant background in the tracheae (Supplementary Table 1) (De Gregorio et al., 2001). These genes may represent the “core” of Imd pathway regulated genes and include *PGRP-SD*, *-SB1* and *-LF*, most AMP genes, genes coding for Imd pathway components (*Pirk*, *Relish*), *TepII* and *Transferrin 1*.

Not surprisingly, the tracheal response to bacteria appears less complex than the response occurring in the gut, this latter also comprising an epithelium renewal response through stem cell proliferation and differentiation (Buchon et al., 2009b). In addition, infection induced in the tracheae new sets of stress response and oxido-reduction genes while others were down-regulated. Prominent among the repressed genes is a large set of chitin binding proteins, especially the *Twdd* family, of which 7 members are down-regulated in the tracheae. As tracheae are known to be covered by a thin chitinous cuticle, called the intima, reinforced by spiral thickenings, the taenidia (Demerec, 1950), our microarray analysis suggests remodeling of this barrier in response to infection.

Thus, natural infection with *Ecc15* alters the physiology of the trachea, with a repression of chitin metabolism and the stimulation of immunity and signaling as well as changes in stress and metabolism.

Role of PGRP-LA in the local response

We next investigated the impact of *PGRP-LA*^{2A} deletion on the transcriptome of trachea. The most significant difference between wild-type and *PGRP-LA*^{2A} was the lower expression of many targets of the Imd pathway,

notably AMP genes, in the unchallenged condition. For instance, expression of *Defensin*, *Drosomyacin* and *Drosocin* were respectively 34, 14 and 13 fold lower in unchallenged *PGRP-LA^{2A}* compared to wild-type larvae (Figure 7A). AMP genes were induced in *PGRP-LA^{2A}* trachea in response to *Ecc15*, but reached a lower level than in wild-type tracheae (Figure 7A, B). To confirm these results, we monitored the level of *Drosomyacin*-GFP in the trachea of wild-type and *PGRP-LA^{2A}* larvae. Figure 7C and D show a substantial reduction of *Drosomyacin*-GFP expression in *PGRP-LA^{2A}* tracheae compared to wild-type. These results were also confirmed by RT-qPCR (Figure 7B) and strongly suggest that PGRP-LA promotes a basal level of Imd pathway activation in the trachea in the absence of infection. Future experiments should address whether the differences in basal stimulation of the Imd pathway in the trachea are directly due to the presence or absence of PGRP-LA or to differences in the composition of the flora in *PGRP-LA^{2A}* and Canton^S strains.

Discussion

In this manuscript, we present an analysis of PGRP-LA function. We show that overexpression of an isoform of PGRP-LA is sufficient to induce the Imd pathway. Nevertheless, PGRP-LA does not seem to be necessary for the induction of either the systemic or gut immune response. Focusing on larval tracheae, where PGRP-LA is highly expressed, our data suggest that PGRP-LA is involved in the basal induction of the Imd pathway. If this is confirmed by further experiments, this will be the first characterization of a positive regulator of the basal immune response in *Drosophila*. Finally, our genome wide analysis of the tracheal response reveals the regulation of both immune and non-immune genes and emphasizes the key role of the Imd pathway as an epithelial regulator of the immune response.

The intracellular domains of PGRP-LA_D, PGRP-LC and PGRP-LE have been reported to contain a conserved RHIM motif, which has been shown, in PGRP-LC and PGRP-LE, to be essential for Imd pathway activation but not for the physical interaction with Imd (Kaneko et al., 2006). Ubiquitous overexpression of *PGRP-LA_D*, but not *PGRP-LA_C* and *PGRP-LA_F*, leads to the activation of *Diptericin* expression. Epistatic experiments placed PGRP-LA_D upstream of Dredd and Tak1. Thus, our results suggest that the RHIM motif of PGRP-LA_D is able to induce the Imd pathway. This prediction could be tested by overexpressing a version of PGRP-LA_D with a mutated RHIM domain. Moreover, such a study would also allow the confirmation of the role of the

RHIM domain *in vivo*, which has as yet only been shown in S2-cells. Interestingly, the RHIM-motifs of PGRP-LC and PGRP-LE have also been shown to interact physically with the Imd pathway regulator pirk (Aggarwal et al., 2008). It could be interesting to study the binding between PGRP-LA_D and pirk.

Mutations in *PGRP-LA* did not increase the susceptibility to oral or systemic infection with the bacteria we tested. In addition to the Imd pathway activity, we also tested whether other immune mechanisms were affected in a *PGRP-LA* mutant. We noticed that phagocytosis was unimpaired in our mutant (data not shown). Previous studies on S2-cells have also revealed that PGRP-LA was implicated in neither the induction of AMP genes by peptidoglycan or Gram-negative bacteria (Choe et al., 2002; Ramet et al., 2002) nor in the phagocytosis of Gram-negative or Gram-positive bacteria (Ramet et al., 2002). Thus, PGRP-LA is apparently not compulsory in the induction of the Imd pathway, but it could still be involved in the fine-tuning of the pathway or in the induction of this pathway under very specific conditions.

In the tracheae, we observed that the expression of AMPs, particularly of *Defensin*, was impaired in *PGRP-LA*^{2A} mutants. Interestingly, the difference was stronger in unchallenged conditions than after infection, suggesting that PGRP-LA is not necessary for the induction of the immune response in the tracheae, but could be involved in the maintenance of Imd pathway signaling at a basal level. We observed that the basal level of Imd signalling was also impaired in *PGRP-LC*^{E12} mutant (data not shown), suggesting that the basal level of the Imd pathway requires both PGRP-LA and PGRP-LC. Nevertheless, these observations need further confirmation. First, the deletion of *PGRP-LA* is not complete in our mutant and we cannot exclude the possibility that this *PGRP-LA*^{2A} deletion leads to the production of a dominant negative protein with only an intracellular domain. Ideally we would need to confirm our observations using a full deletion of *PGRP-LA* or *in vivo* RNAi. Second, we cannot yet rule out that the effect observed is not linked to the genetic background of our strains. To limit this risk, we partially introgressed *PGRP-LA*^{2A} mutation into the CantonS background, but there is still 1/8th of the genome which is different. A rescue experiment could confirm that the phenotype observed is really linked to the *PGRP-LA* deletion. Nevertheless, as we know that PGRP-LA_D can induce the Imd pathway, an overexpression approach would not be ideal to rescue the role of PGRP-LA in the basal immune response. Thus, a real rescue would require the re-introduction of *PGRP-LA* with its own promoter into a *PGRP-LA*^{2A} mutant. The level of basal AMP production has already been proposed to be involved in

the resistance against infection. Indeed, higher basal expression of AMP genes, especially *Defensin*, has been linked to *Wolbachia* induced resistance to Dengue virus in *Aedes aegypti* (Bian et al., 2010).

In this study, we also present a general analysis of the tracheal transcriptome after natural infection in larvae. Our data reveal a major role of the Imd pathway, which controls the expression of half of the genes regulated upon infection and of most of the genes with an immune signature, such as AMPs. We note that it also regulates genes involved in other cellular functions such as metabolism. This pathway has already been shown to control the production of some AMPs, mainly Drosomycin, in the tracheae (Tzou et al., 2000). Interestingly, we observed that many genes encoding putative or characterized cuticular proteins are down-regulated upon infection. As the cuticle of the tracheae has a very complex structure, containing particularly a helicoidal taenidia, many genes are probably involved in its construction and regulation. Therefore, the down-regulation of structural genes upon infection could be a mechanism saving energy for the immune response, which has high energetic costs. Consistent with this down-regulation, an apical-basal enlargement of the cells of the airway epithelium has been previously reported in regions of the tracheae exhibiting a strong immune response (Wagner et al., 2009). This enlargement could be explained by a thinning of the cuticle and consequent loss of rigidity.

Together, our data underline the key role of the Imd pathway in tracheal immunity and suggest that PGRP-LA is required for the maintenance of a basal immunity in this tissue. Further work is needed to confirm this role and further characterize the molecular function of PGRP-LA.

Materials and methods

Fly Stocks

Oregon^R flies were used as wild-type controls for the PGRP-LA^{2A} original strain (Figures 2C, D; 4A, B, C, F; 5A, C), and Canton^S flies were used as wild-type controls of PGRP-LA^{2A} introgressed into the Canton^S background (Figures 2B; 4D, E, G; 5B; 6; 7). Over-expression experiments were controlled by crossing the *da-Gal4* driver to *w¹¹¹⁸*, the strain in which the UAS construct insertions were generated. *Relish^{E20}* (*e⁺*, *Rel^{E20}*), *Dredd^{B118}*, *Tak1^{D10}*, *PGRP-LC^{E12}* and *Spätzle^{rn7}* are described elsewhere (Gottar et al., 2002; Hedengren et al., 1999; Leulier et al.,

2000; Romeo and Lemaitre, 2008; Vidal et al., 2001). The *da-Gal4* line expresses Gal4 constitutively.

The *UAS-PGRP-LA_C-YFP* (insertion R2), *UAS-PGRP-LA_D-YFP* (insertion R1) and *UAS-PGRP-LA_F-YFP* (insertion R4) lines were obtained as follows. A full-length cDNA of each isoform of *PGRP-LA* (using the *CG32042*_cDNA gold GH4960, GH18280 and GH10945, respectively, from DGRC) was placed downstream of the UAS sequence using the pUAS_t vector. The *UAS-PGRP-LA_{C/D/F}-YFP* transgenes were obtained by a fusion of YFP to the C-terminus of PGRP-LA inserted in the pDONR221 Gateway entry clone (Invitrogen), and finally subcloned in the pTWG transgenesis vector. F1 progeny young adults carrying both the *UAS* construct and the *Gal4* driver were transferred to 29°C for optimal efficiency of the UAS/Gal4 system. *Drosophila* stocks and crosses were maintained at 25°C in yeasted tubes containing corn-meal fly medium.

Bacterial and fungal stocks

All bacteria were stored as frozen stocks (15% DMSO). *Erwinia carotovora carotovora 15* strain (*Ecc15*), *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas entomophila* and *Micrococcus luteus* were described previously (Romeo and Lemaitre, 2008). They were cultured on LB-Agar plates and grown overnight in LB-medium at 29°C and used as pellets of OD₆₀₀=200, unless otherwise noted. *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans* were described previously (Romeo and Lemaitre, 2008). They were grown overnight at 37°C, respectively in LB-medium, BHI and YPG.

Infection and survival experiments.

Septic injuries were performed by pricking adults in the thorax with a thin needle dipped into a concentrated bacterial pellet. Genital infections were performed by touching a 200µL pipette-tip containing 10µL of bacterial pellet to the tip of the abdomen. Oral infections were performed by feeding adults with a concentrated bacterial pellet supplemented with sucrose, as described previously (Romeo and Lemaitre, 2008). A minimum of 20 flies was used for survival experiments and survival was scored twice a day. Natural infections in larvae were performed by depositing 500µL *Ecc15* pellet into 28.5mm-wide vials were

larvae were developing. Adults were allowed to lay eggs for 3 days then removed, and bacteria were added on the 4th day. The vials were then put at 18°C for 24 hours and 3rd instar larvae inside the medium, of medium size were dissected. Anterior spiracles were verified as having a hand-like form, indicative of 3rd instar larvae.

RT-qPCR

AMP and *rpL32* mRNA quantification by RT-qPCR was performed as described previously (Romeo and Lemaitre, 2008). All expression data are given as a ratio of the expression level of the invariant mRNA *rpL32*. Each experiment was performed with approximately 20 flies for each genotype.

Microarray Analysis

RNA pools from the tracheae of 50 3rd instar larvae were isolated, purified with RNA clean-up purification kits (Macherey Nagel), and DNase treated. RNA was quantified by NanoDrop ND-1000 and RNA quality was controlled on Agilent 2100 Bioanalyzer chips. For each sample, 1 mg of total RNA was amplified and labeled using the GeneChip IVT Labeling Kit according to the protocol provided by the supplier. Affymetrix Drosophila Genome 2.0 arrays were hybridized with 30 mg of labeled cRNA, washed, stained, and scanned according to the protocol described in the Affymetrix Manual. Three independent repeats were performed for each time point and gene expression profiles from challenged flies were normalized to the sucrose-fed adults of the same time point. Statistical analyses were performed using the R and Bioconductor statistical packages.

Imaging

For GFP observation, flies were dissected in PBS and either directly observed under a Leica MZ16F dissecting microscope, or mounted in PBS for imaging with a Zeiss Axioimager Z1. β -galactosidase was visualised by X-gal staining, as previously described, followed by mounting in a 50:50 mix of ethanol and glycerol (Romeo and Lemaitre, 2008). Images were captured with a Leica

DFC300FX camera and Leica Application Suite or with an Axiocam MRn camera and Axiovision respectively.

PGN and TCT

All PGN was prepared as described in Leulier et al, 2003. Each PGN was used at a monomer equivalent concentration of 5mmol.L^{-1} . For production of TCT, *E. coli* PGN was purified from the BW25113 $\Delta lpp::\text{Cm}^R$ strain that does not express the Braun lipoprotein and digested by SltY lytic transglycosylase.

Elicitor injection

PGN, TCT and water were injected using a Nanodrop microinjector (NanjectTM). Flies were pricked in the thorax with a glass needle containing the elicitor and 10nL were injected.

Accession Numbers.

The Flybase (www.flybase.org) accession numbers for genes mentioned in the micro-array are indicated in the data. The accession numbers for genes mentioned in the rest of this study are:

Defensin (CG1385), *Diptericin* (CG12763), *Drosocin* (CG10816), *Drosomycin* (CG10816), *PGRP-LA* (CG32042), *PGRP-LB* (CG14704), *PGRP-LC* (CG4432), *PGRP-LF* (4437), *da* (*daughterless*, CG5102), *pirk* (CG15678) and *Relish* (CG11992)

Acknowledgements

We thank the Lausanne Genomic Technologies Facility for performing micro-array experiments and statistical analysis, Dominique Mengin-Lecreulx for the kind gift of PGN and TCT, Shoichiro Kurata for the *PGRP-LE¹¹²* fly strain and David Welchman for the *PGRP-LB¹²* fly strain and for critical reading of the manuscript.

Figure legends

Figure 1. Description of *PGRP-LA* genomic locus and isoforms

A. Scheme of the locus containing *PGRP-LA*, *PGRP-LC* and *PGRP-LF*. Each gene contains at least one PGRP domain (red) and *PGRP-LA* and *LC* contain a transmembrane domain (TM, green) and a RHIM motif (blue). No signal peptide has been predicted in the *PGRP-LA* sequence, and the C-terminal sequence (purple) contains 2 Cys residues. *PGRP-LA* encodes three isoforms, depicted under the gene: boxes represent the exons, of which the coding sequence is colored in red. *PGRP-LA^{2A}* deletion was performed by imprecise excision of the *P*-element G14937 (KAIST library) and *LALC^Δ* by FRT mediated deletion of the region between the *P*-elements 1930 and 4396. *PGRP-LC^{ΔE12}* deletion has already been published (Gottar et al., 2002). In *PGRP-LA_C*, the hatched box represents a sequence between a start and a stop codon, but which is not predicted to be the coding sequence (Flybase).

B. Over-expression of *PGRP-LA* isoforms fused to YFP under the control of the ubiquitous *da-Gal4* driver. *PGRP-LA_D-YFP* is localised in punctate structures in the cell whereas *PGRP-LA_F-YFP* is enriched at the cell membrane. Unexpectedly, *PGRP-LA_C-YFP* was only observed in the ovary, in the epithelial follicle cells that form the sheath surrounding ovarioles.

Figure 2. *PGRP-LA* is most expressed in the eye, hindgut, salivary gland and trachea.

A. Microarray tissue-specific expression of *PGRP-LA*, data from Flyatlas (Chintapalli et al., 2007). Thoracicoabd gg – thoracicoabdominal ganglion, V. and M. spermatheca – virgin and mated spermatheca, respectively

B-D. RT-qPCR analysis of *PGRP-LA* expression in several tissues of females (**B**), during development (**C**) and in adults subjected to a septic injury with *M. luteus* (**D**). L1, L2, L3 – respectively 1st, 2nd and 3rd instar larvae, P – Pupae, M – Males, F – Females, UC - Unchallenged

Figure 3. PGRP-LA_D overexpression leads to induction of the Imd pathway.

A. Measurement of *Diptericin* by RT-qPCR in males over-expressing each isoform of *PGRP-LA*. For each isoform, strains (1) and (2) carry independent insertions of the transgene.

B. Measurement of *Diptericin* by RT-qPCR in *Dredd* or *Tak1* deficient males over-expressing *PGRP-LA_D*. Results are shown as percentage of *Dpt* expression in wild type controls, 6h after septic injury with *Ecc15*.

Figure 4. Systemic immune response and survival rate are not impaired in PGRP-LA^{2A} mutant flies upon infection

A-C. *Dpt* expression in wild-type and *PGRP-LA^{2A}* flies after septic injury with *Ecc15* (A), *L. monocytogenes* (B) and after injection of TCT (0.1mg.mL⁻¹) or PGN (5mg.mL⁻¹) in females (C).

D. *Drs* expression in wild-type and *PGRP-LA^{2A}* flies after septic injury with *M. luteus*.

E-G. Survival analysis of adults (males or females) upon septic injury with *Ecc15* (E), *L. monocytogenes* (F) and *M. luteus* (G). In **A**, **F**, **G**, data are the mean of 2 repeats and error bars show data range. In **B-D**, one experiment is shown and has yet to be repeated. In **E**, data are the mean of three independent repeats and error bars show standard errors. *LA^{2A}* – *PGRP-LA^{2A}*; *LC^{E12}* – *PGRP-LC^{E12}*; *LALC^Δ* – (*PGRP-LA*, *PGRP-LC*)^Δ; *LE^{I12}* – *PGRP-LE^{I12}*; *Rel^{E20}* – *Relish^{E20}*; *Spz^{rm7}* – *Spätzle^{rm7}*

Figure 5. PGRP-LA is dispensable for long-range activation of the systemic immune response

RT-qPCR analysis of *Dpt* expression in females after oral infection with *P. entomophila* (A) or *Ecc15* (B) and upon genital infection in males by *Ecc15* (C). Data are the mean of two repeats and error bars show data range. *LB^{I2}* – *PGRP-LB^{I2}*; *LA^{2A}*, *LB^{I2}* (1) and (2) are two strains derived from independent recombination events.

Figure 6. Microarray characterization of the tracheal immune response

A. Distribution and regulation of genes, based on their fold change. The number of genes regulated by Relish is indicated in black.

B. Comparison of the distribution of genes up-regulated in the tracheae upon *Ecc15* natural infection to that of genes induced in the gut upon *Ecc15* ingestion and in whole flies upon septic injury with *Ecc15* (Buchon et al., 2009b; De Gregorio et al., 2001).

C. Repartition of induced (left) and repressed (right) genes in defined categories of gene ontology.

Figure 7. Effect of *PGRP-LA* deletion on the tracheal immune response

A. List of the genes that are down-regulated (left) or up-regulated (right) in the *PGRP-LA*^{2A} mutant, with a fold change >3 in either unchallenged or infected conditions. Data are from a microarray analysis.

B. Confirmation of the expression of AMP genes in the tracheae of wild type, *Relish*^{E20} and *PGRP-LA*^{2A} larvae using RT-qPCR quantification. Data are the mean of 3 independent repeats and error bars show standard error. *Drs* – *Drosomycin*; *Dpt* – *Diptericin*; *Def* – *Defensin*

C. Fluorescence observed in the tracheae of wild type and *PGRP-LA*^{2A} larvae expressing the *Drs*-GFP reporter gene. (-) no fluorescence (+) fluorescence in the spiracles only, (++) in the tracheal trunks, (+++) in the tracheae in less than half of the larva or (+++++) in the tracheae in more than half of the larva. *, **, ***: increasing intensity of fluorescence

D. Images of the larvae classified as “+++++” in C: note the weakness of the signal in *PGRP-LA*^{2A} mutant. In C-D, quantification was based on 20 larvae chosen randomly for each strain and this experiment is representative of two other independent experiments without any precise quantification.

Supplementary Table 1.

Expression profile of the genes regulated in the tracheae upon natural infection in larvae.

List of the genes showing a fold change >2 , upon *Ecc15* infection, in the tracheae of Canton^S larvae. Fold changes in Canton^S and *Relish*^{E20} are indicated. In the “Rel” column, “R” indicates the genes whose regulation is affected in *Relish*^{E20} mutant. The columns “sys”, “gut” and “sys+gut” show respectively the genes regulated in the gut upon *Ecc15* ingestion (Buchon et al., 2009b), in whole flies upon septic injury with *Ecc15* (De Gregorio et al., 2001) and in both conditions: for each tissue, “+” means that the gene is up-regulated “-” that it is repressed. AvgExp: mean signal over all chips.

Figure 1

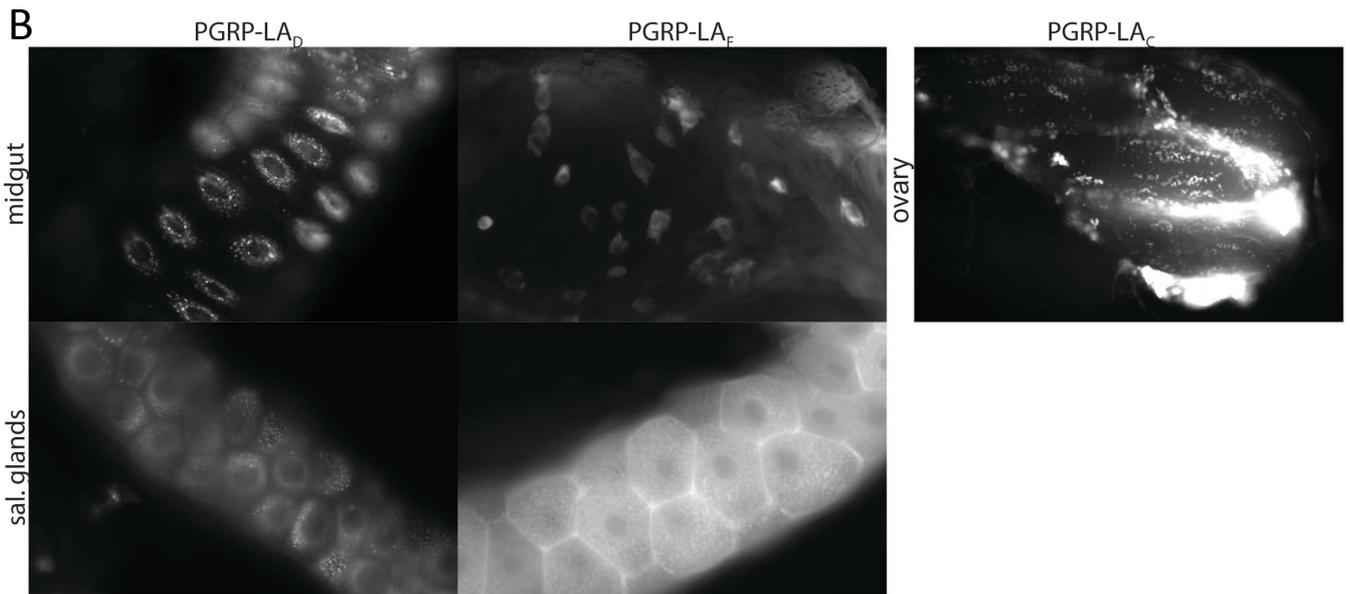
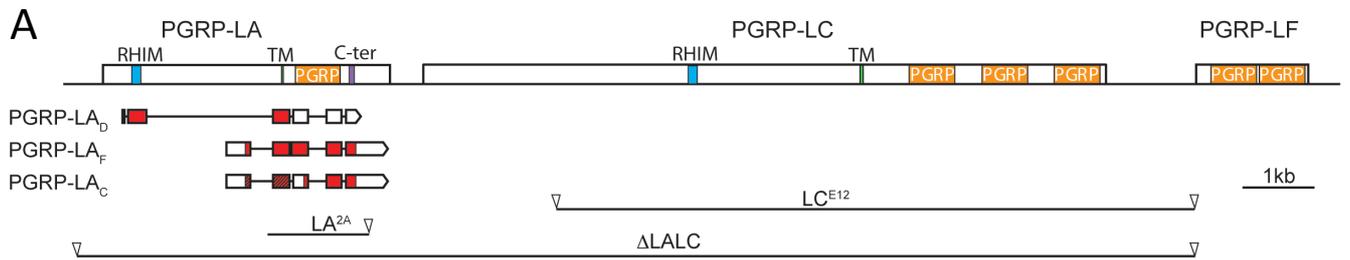


Figure 2

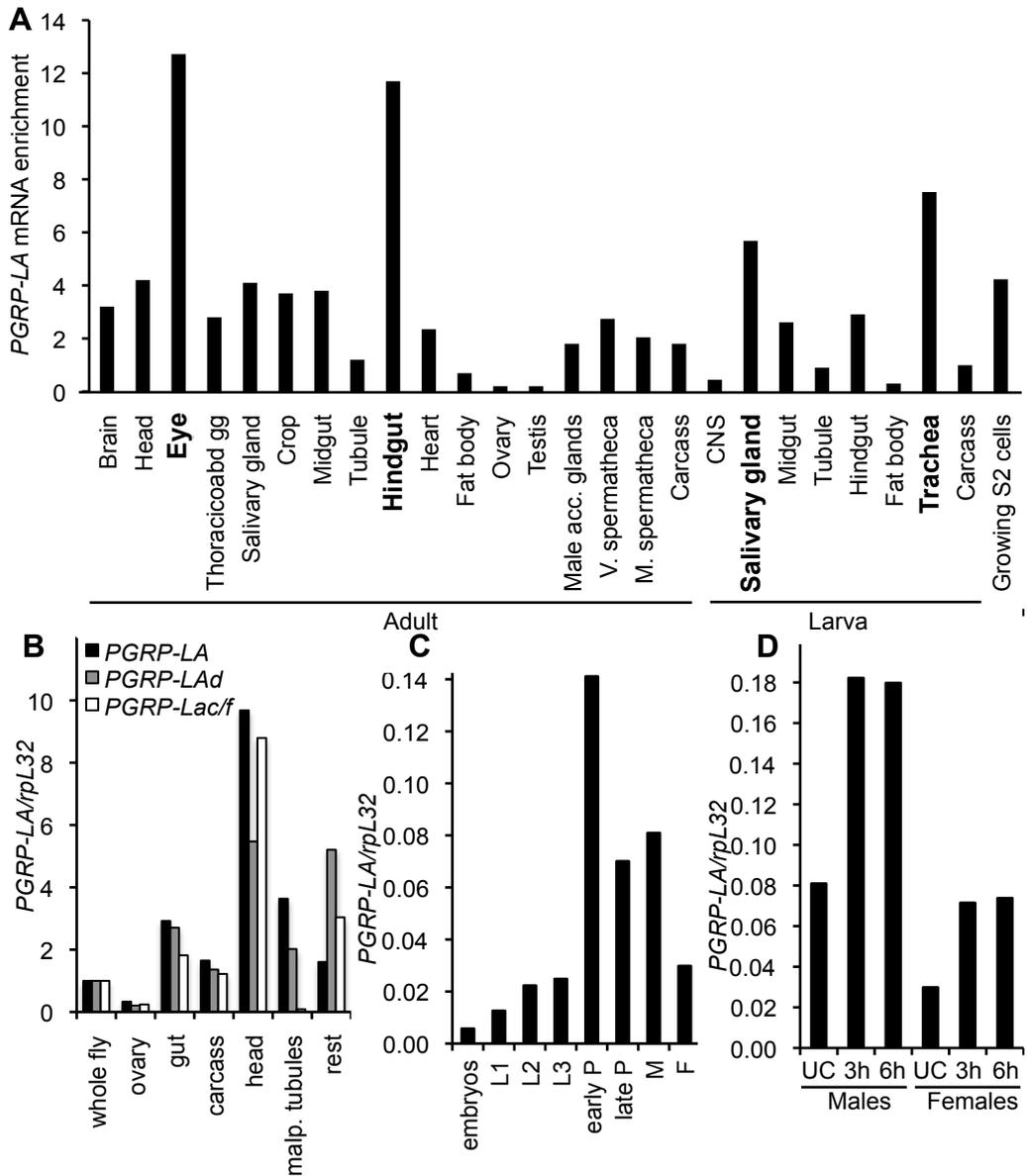


Figure 3

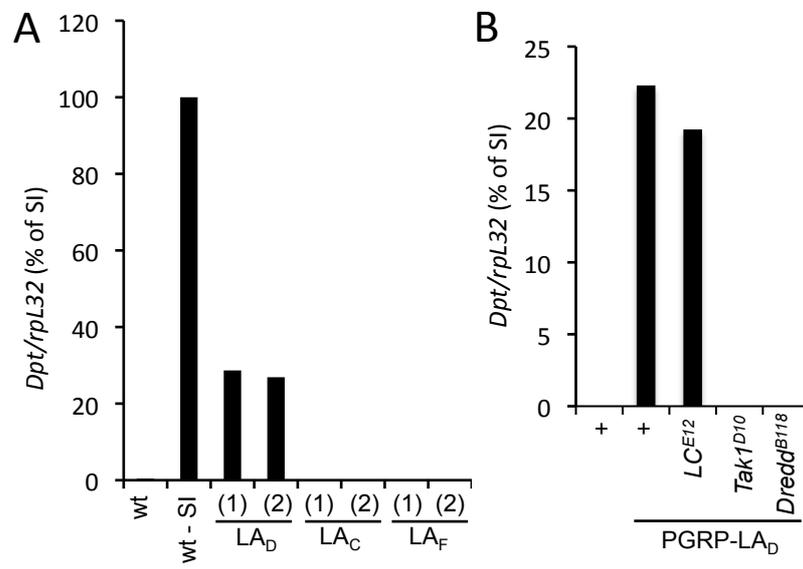


Figure 4

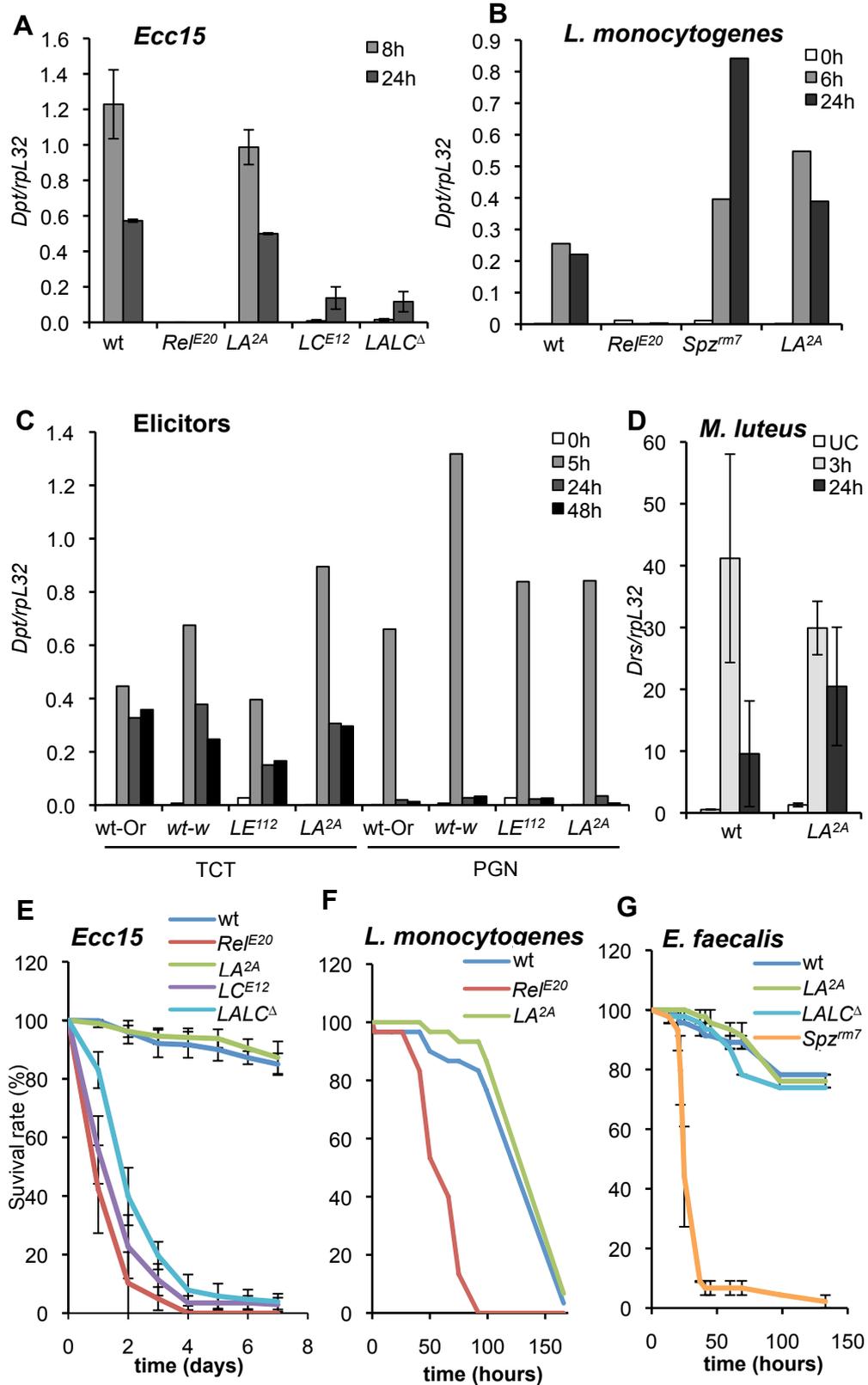


Figure 5

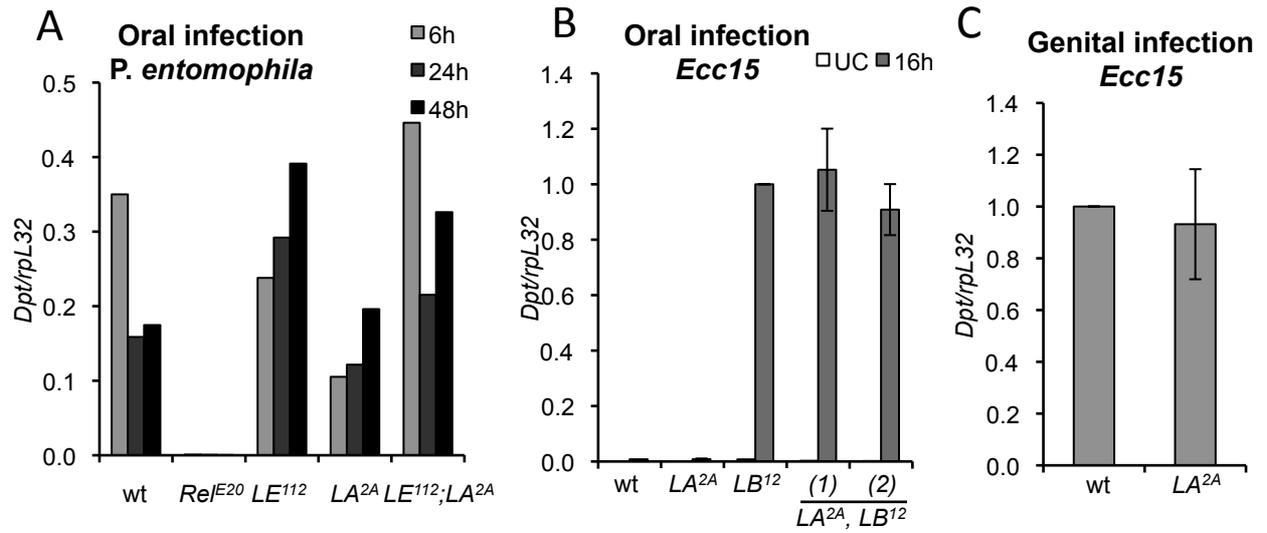


Figure 6

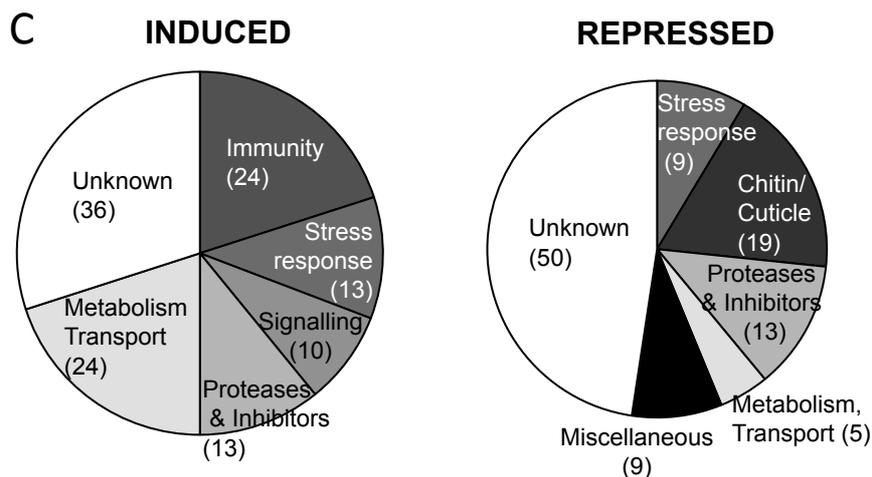
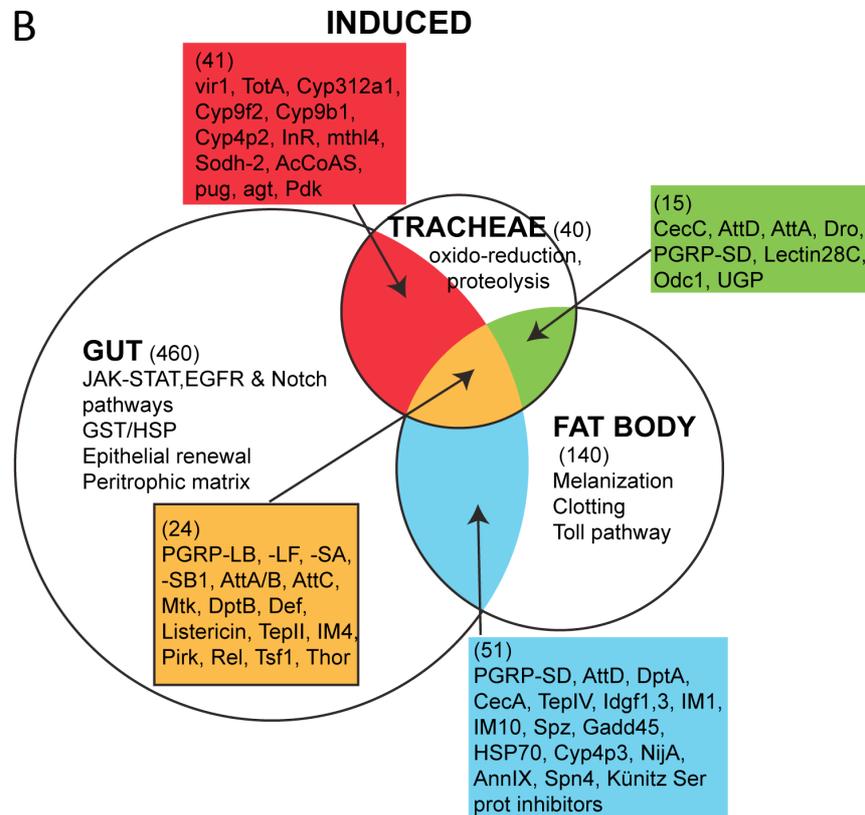
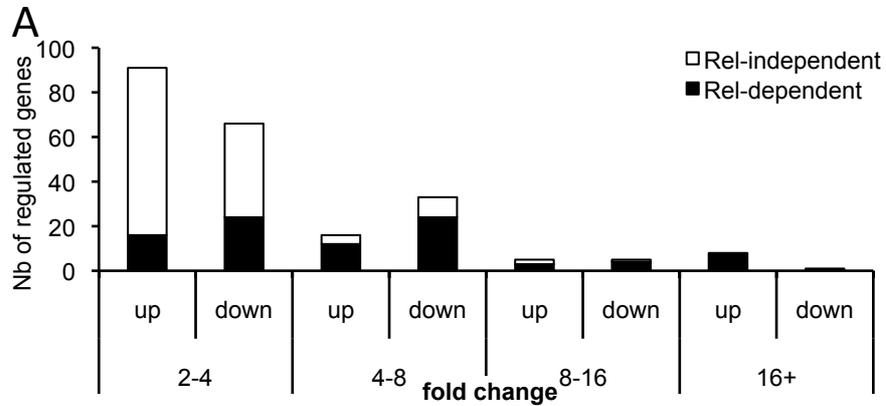
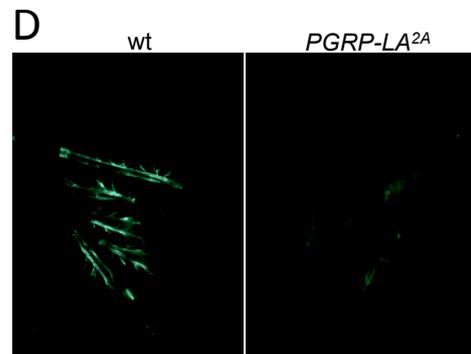
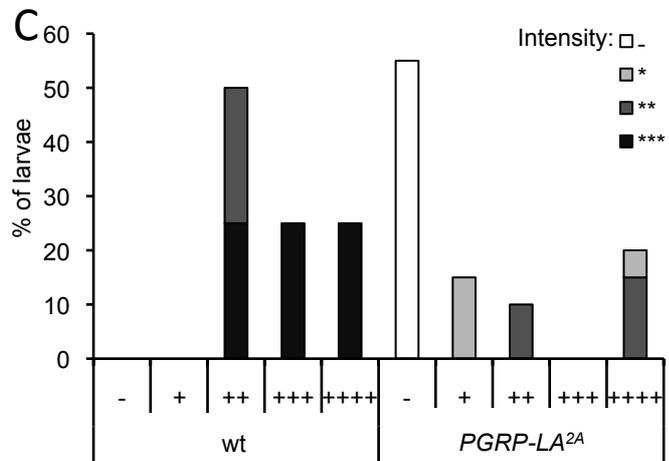
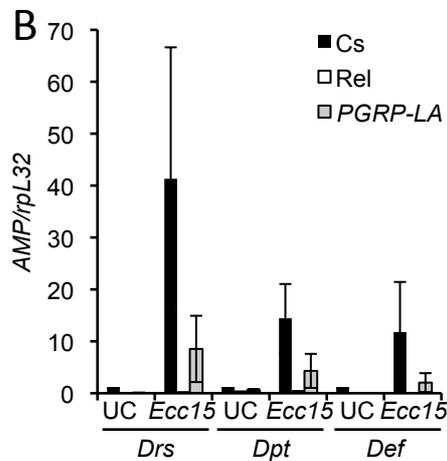


Figure 7

A Genes downregulated in PGRP-LA mutant Genes upregulated in PGRP-LA mutant

Gene	CG	Function	LA ^{2A} /Cs				Ecc15/UC				Gene	CG	Function	LA ^{2A} /Cs				Ecc15/UC			
			UC	Ecc15	Cs	Rel ^{E20}	UC	Ecc15	Cs	Rel ^{E20}				UC	Ecc15	Cs	Rel ^{E20}	UC	Ecc15	Cs	Rel ^{E20}
PGRP-LA	CG32042		-43.8	-81.1	1.9	1.5	Cyp6a23	CG10242	Oxidation reduction	5.7	8.2	1.4	1.5								
Def	CG1385	AMP	-33.8	-2.7	3.9	1.1	Cyp4g1	CG3972	Oxidation reduction	3.4	1.2	3.1	-1.5								
Drs	CG10810	AMP	-13.6	-1.7	5.3	8.9	CG6142	CG6142	Oxidation reduction	1.2	3.1	1.4	-1.0								
Dro	CG10816	AMP	-12.5	-5.6	7.2	-1.1	CG18349	CG18349	Cuticle	6.0	5.8	-1.2	-1.4								
AttA	CG10146	AMP	-4.0	-1.7	16.1	-1.2	sut2	CG17975	Transport	10.4	10.2	-1.1	-1.1								
Listericin	CG9080	AMP	-3.2	-1.4	8.2	-1.1	l(2)03659	CG8799	Transport	3.9	3.5	-1.3	1.0								
AttD	CG7629	AMP	-1.3	-3.9	17.1	1.0	CG8850	CG8850	Neurotransmitter transport	1.9	4.0	1.1	1.2								
DptB	CG10794	AMP	-1.8	-3.0	16.8	-1.0	CG7722	CG7722	Serpin	3.6	3.9	1.1	1.8								
CG30427	CG30427	Phagocytosis	-1.7	-3.7	2.7	1.1	CG13748	CG13748	Serpin	-1.3	3.2	-1.4	1.2								
CG3502	CG3502	Proteolysis	-4.8	-2.0	-4.6	-1.9	CG11529	CG11529	Serine protease	1.5	2.9	2.0	4.1								
CG14568	CG14568	Protein binding	-4.4	-1.5	-15.0	-2.1	CG8539	CG8539	Proteolysis	3.6	3.4	1.9	1.8								
CG14569	CG14569	Protein binding	-3.9	-1.3	-12.0	-2.6	CG15661	CG15661	Metabolism	3.7	3.3	1.9	1.1								
CG13066	CG13066	Protein binding	-3.0	-1.1	-9.1	-2.1	CG2121	CG2121	Muscle contraction	4.1	2.8	1.1	-1.1								
CG3699	CG3699	Oxidation reduction	-3.9	-1.2	-4.0	-3.2	CG15308	CG15308	Unknown	12.9	13.0	-1.3	-1.6								
CG34462	CG34462	Cuticle	-3.6	-4.7	1.2	2.2	CG12522	CG12522	Unknown	10.8	-1.1	-1.0	1.1								
Cht5	CG9307	Chitin metabolism	-3.4	1.1	-7.6	-1.8	CG18343	CG18343	Unknown	10.3	5.5	1.9	1.2								
Cpr67Fa1	CG18349	Cuticle	-2.3	-3.0	-1.0	-1.1	CG32071	CG32071	Unknown	5.3	1.0	1.0	-1.1								
CG13060	CG13060	Unknown	-8.5	-2.3	-6.6	-3.0	CG13297	CG13297	Unknown	3.6	2.6	-1.4	-3.6								
CG13679	CG13679	Unknown	-5.0	-1.4	-23.7	-4.1	CG2444	CG2444	Unknown	-2.3	6.8	-2.6	-1.4								
CG13041	CG13041	Unknown	-4.6	-1.8	-11.2	-10.3	CG13230	CG13230	Unknown	1.7	3.8	1.3	1.6								
CG14324	CG14324	Unknown	-4.3	1.1	-9.1	-1.3	CG16898	CG16898	Unknown	1.2	3.0	1.1	-1.1								
CG6602	CG6602	Unknown	-4.0	-7.3	1.8	-1.1															
CG32368	CG32368	Unknown peptide	-3.7	-11.9	4.9	-1.2															
CG14417	CG14417	Unknown	-2.3	-3.1	2.6	-1.2															

color legend: >2 (yellow), >4 (orange), >8 (red), >16 (dark red); <-2 (blue), <-4 (dark blue), <-8 (very dark blue), <-16 (black)



Gene.Title	Gene.Symbol	CG	Rel	sys.	gut	sys+ gut	CsEcc15	RelEcc15	RelUC	RelEcc15 vs CsUC	AvgExpr vs RelUC
INDUCED											
IMMUNITY											
Antimicrobial peptides genes											
							Total 92	Total 35	Total 42	Total 22	
Metchnikowin	Mtk	CG8175	+	+	+	+	57.2	1.1	-1	1.1	3.5
attacin	AttC	CG4740	+	+	+	+	23.4	-1.8	-1.7	-1.1	5.9
Cecropin	CecC	CG1373	+	+	+	+	18.9	-1.1	-1.1	1	2.7
attacin	AttD	CG7629	+	+	+	+	17.1	-2	-2	1	4.7
dipteracin-like protein	DptB	CG10794	+	+	+	+	16.8	-3.7	-3.7	-1	6.9
attacin /// attacin	AttA /// AttB	CG18372	+	+	+	+	16.3	-5.8	-6	1	7.9
attacin	AttA	CG10146	+	+	+	+	16.1	-14.3	-11.8	-1.2	7.7
drosocin	Dro	CG10816	+	+	+	+	7.2	-16	-14.2	-1.1	7.8
drosomycin	Drs	CG10810	+	+	+	+	5.3	-9.8	-87.6	8.9	11.4
defensin	Def	CG1385	+	+	+	+	3.9	-62.4	-70.7	1.1	11.3
Defense reaction											
Transferrin 1	Tsf1	CG6186	+	+	+	+	3.6	-1.1	1.3	-1.4	9.6
virus-induced RNA 1	vir-1	CG31764					2.1	4	1.8	2.3	9
Recognition											
PGRP-SD	PGRP-SD	CG7496	+	+	+	+	7.3	-2.3	-1.9	-1.2	5.6
PGRP-SB1	PGRP-SB1	CG9681	+	+	+	+	6.7	-2	-1.4	-1.4	6.5
PRGP-like	PGRP-LF	CG4437	+	+	+	+	5.3	1.8	-1.5	2.6	8
Peptidoglycan recognition protein LB	PGRP-LB	CG14704	+	+	+	+	2.4	1.8	1	1.7	5.4
semmelweis	PGRP-SA	CG11709	+	+	+	+	2	1.5	1.1	1.4	10.1
Thiolester containing protein I	TepI	CG18096	+				4.8	2.8	5.1	-1.8	4
Thiolester containing protein II	TepII	CG7052		+	+	+	2.9	1.3	-1.1	1.5	8.3
Lectin28C /// rhodopsin	lectin-28C /// ninaE	CG7106	+	-			2.5	-1.6	-1.7	1.1	6.3
galactin	Lectin-galC1	CG9976	+				2.4	-5.9	-3.2	-1.8	6.6
Imd pathway											
CG15678	pirk	CG15678	+	+	+	+	3.8	1.1	1.6	-1.5	5.6
relish	Rel	CG11992	+	+	+	+	2.7	-37	-42.9	1.2	9.5
Phagocytosis											
CG30427	CG30427	CG30427	+				2.7	-2.2	-2.5	1.1	7.1
STRESS RESPONSE/DETOXIFICATION											
Stress response											
Turandot A	TotA	CG31509	+		+		21.3	28.3	8.3	3.4	4.3
Cyp312a1	Cyp312a1	CG5137					2.7	4.9	1.5	3.1	6.6
Heat shock protein cognate 1	Hsc70-1	CG8937					2.6	-1	-1.6	1.6	5.7
Cyp9f2	Cyp9f2	CG11466					2.3	3.5	1.7	2	8.9
Cyp4d21	Cyp4d21	CG6730					2.4	-9.9	-13.6	1.4	7.7
Cytochrome P450-4e1	Cyp4e1	CG2062					2	4.7	3.5	1.4	6.1
Cytochrome P450-9b1	Cyp9b1	CG4485			-		2	2.1	1.4	1.5	7.6
Cyp313a2	Cyp313a2	CG10094					2	4.4	2.4	1.8	7.8
Cyp4p2	Cyp4p2	CG1944					2.2	-2.4	-2.9	1.2	6.3
ROS detoxification											
CG10962	CG10962	CG10962	+		+		7.3	1	-1.3	1.4	6.3
CG12466 /// CG40486	CG12466 /// CG40486	CG40486					3.2	7	3.2	2.2	3
CG3835	CG3835	CG3835			+		2.1	1.8	-1.1	2	10
CG3301	CG3301	CG3301		+	-		2.1	1.4	-1.3	1.8	5.9
SIGNALING											
Insulin pathway											
insulin-stimulated eIF-4E binding protei	Thor	CG8846		+			2.2	3.1	1.5	2.1	11.1
insulin receptor	InR	CG18402					2	2.3	-1	2.3	5.7
Signaling											
medullaless	ana	CG8084					2.8	3.7	1.1	3.4	4.7
methuselah-like 4	mthl4	CG6536			+		2.5	3.1	1.5	2	8
CG11438	CG11438	CG11438					2.3	4.7	1.9	2.5	6.8
CG8334	CG8334	CG8334					2.4	1.3	1.1	1.2	6
CG11919 /// CG18003	CG11919 /// CG18003	CG30019					2.3	-1.3	-2.3	1.7	6.4
CG8965	CG8965	CG8965		+			2.1	2.2	1.6	1.4	6.1
focal adhesion kinase	PR2	CG3969					2.1	1.2	1	1.2	8.5
CG17278	CG17278	CG17278		+			2	-1.3	-1.3	1	11.1
PEPTIDASE&INHIBITOR											
Serine protease											
CG11668	CG11668	CG11668	+				6	1	1.1	-1.1	5.6
CG6639 /// Regulator of G-protein sign	CG6639 /// RSG7	CG6639		+			5.6	2.4	-1.6	4	6.3
CG18563	CG18563	CG18563		+			3.3	1.8	-1.4	2.5	5.7
CG5909	CG5909	CG5909		+			2.7	-1.5	-1.7	1.1	5.4
CG17572	CG17572	CG17572					2.2	4.2	2.7	1.5	6.6
CG11313	CG11313	CG11313		+			2.1	-1.9	-1.8	-1	6.5
CG5896	grass	CG5896					2.1	1.2	1	1.2	10.1
CG11529	CG11529	CG11529					2	4	-1	4.1	7.7
Serine-type endopeptidase inhibitor activity											
CG16713	CG16713	CG16713		+	+	+	2.7	-1.6	-4.7	3	7.7
CG6663	CG6663	CG6663		+	-		2.3	1	1.1	-1	5.1

Other peptidase

CG5863	CG5863	CG5863				3.5	1.5	-1.4	2.1	7.1
CG6357	CG6357	CG6357	+	+	+	3.4	4	1.8	2.2	6.1
CG13283	CG13283	CG13283				2.1	2.1	-1	2.1	5.3

METABOLISM/TRANSPORTERS

Transporters

CG8785	CG8785	CG8785	+	+		4.6	-1.6	-2.2	1.4	7.3
CG4607 /// CG4607	CG4607 /// DsimCG4607	CG4607	+			2.7	-1.6	-1.2	-1.4	8.7
CG8925	CG8925	CG8925			-	2.2	2	1.2	1.7	7.5
CG4484	CG4484	CG4484				2.1	3.1	2.4	1.3	7.6
Epidermal stripes and patches	Esp	CG7005				2.1	-1.2	-2.2	1.9	6.7

Metabolism

CG4716 /// CG4716	CG4716 /// DsimGD10957	CG4716			-	11.7	3.4	-7.1	24.3	7
CG4757	CG4757	CG4757	+	+		7.9	94.9	147.3	-1.6	4.8
ornithine decarboxylase	Odc1	CG8721			-	3.2	2.5	-1.2	3	5.3
CG6461 /// CG6461	CG6461 /// DmirCG6461	CG6461	+			3	1.1	1.1	-1	7.6
CG18473	CG18473	CG18473	+			2.9	2.1	1.7	1.3	5.2
CG9452	CG9452	CG9452				2.7	1.4	-1.4	1.9	6.3
UTP-G-1-P uridylyltransferase	UGP	CG4347			-	2.6	-2.1	-3.3	1.5	7.3
lysyl oxidase-like 2	lox2	CG4402				2.6	2.4	1	2.2	7.6
Sorbitol dehydrogenase-2	Sodh-2	CG4649				2.5	4.2	1.8	2.3	9.7
CG18067	CG18067	CG18067	+	+	+	2.4	3.4	2.3	1.5	10.2
CG30359	CG30359	CG30359				2.4	1.6	-1.1	1.9	8.9
Acetyl CoA synthetase	AcCoAS	CG9390				2.4	1.1	-1.4	1.5	9.8
Pugilist	pug	CG4067			+	2.2	1.2	-1.6	1.8	7.6
CG5431	CG5431	CG5431				2.1	4.1	3.8	1.1	7
O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase	agt	CG1303	+			2.1	2.9	1.7	1.7	7.4
pyruvate dehydrogenase kinase	Pdk	CG8808			-	2	3.4	2.2	1.5	7.7
CG4576	CG4576	CG4576				2.2	4	1.6	2.5	8.5
CG9510 /// CG9515	CG9510 /// CG9515	CG33085				2.1	-1.6	-2	1.3	7.4
CG14935 /// ---	CG14935 /// DsecCG14935	CG14935				2	2.4	1.2	1.9	7.6

UNKNOWN

Unknown

CG14419	CG14419	CG14419	+			10.7	-1.3	-2.1	1.5	8.6
CG13335	CG13335	CG13335	+	+		6.2	5.5	3.2	1.7	6.1
CG8160	CG8160	CG8160				4.6	2.9	-3.2	9.1	5.5
CG9400	CG9400	CG9400				3.6	2.4	-1.9	4.6	9
CG16743	CG16743	CG16743		+		3.5	1.7	-1.6	2.7	7.7
CG13077	CG13077	CG13077	+	+	+	3	-1.1	-1.1	1	4.8
CG7330	CG7330	CG7330				3	2.2	-1.6	3.4	7.6
CG34035	CG34035	CG34035	+			2.7	-6.6	-2	-3.3	9
CG5953	CG5953	CG5953			+	2.6	4.6	1.3	3.5	6.1
CG14417	CG14417	CG14417	+			2.6	-4.4	-3.7	-1.2	6.8
CG42319	CG42319	CG17041				2.5	2.6	-1.5	3.8	8.9
CG10562	CG10562	CG10562				2.5	1.8	1.1	1.6	5.2
CG14515	CG14515	CG14515				2.4	-1.2	-2.7	2.3	7.6
CG32040	CG32040	CG32040				2.3	3	1.8	1.7	5.2
CG15545	CG15545	CG15545				2.3	4.8	2.8	1.7	6
CG10383	CG10383	CG10383				2.3	3.8	1.5	2.5	7.7
CG15394	CG15394	CG15394			+	2.3	-1.6	-3	1.8	7.1
elastin-like	Ela	CG7021				2.1	1.3	1	1.2	8.3
CG14949	CG14949	CG14949			+	2.1	5.8	2.5	2.3	5.8
CG31102	CG31102	CG31102			-	2.1	1.5	-1.6	2.4	7.9
CG6834	CG6834	CG6834				2.1	1.9	-1.2	2.2	6.7
CG5295	bmm	CG5295				2	2.6	1.2	2.2	6.7
CG5928	CG5928	CG5928				2	2	1.4	1.5	8.9
CG31839	nimB2	CG31839				2	2.4	1.5	1.7	9.7
CG9766 /// ---	CG9766 /// DsimCG9766	CG9766				2	-1.7	-1.9	1.1	4.2

Unknown Peptides (<134)

Immune induced molecule 4	IM4	CG15231			-	12.2	10	1.4	7.1	5.5
CG32185	CG32185	CG32185	+	+		12.1	1.1	-1	1.1	5
CG9080	CG9080	CG9080	+	+	+	8.2	-7.4	-6.5	-1.1	7.1
CG32368	CG32368	CG32368	+	+		4.9	31.8	36.7	-1.2	5.1
CG13482	CG13482	CG13482	+	+		4.4	1.2	1	1.1	4.5
CG16926	CG16926	CG16926				4.2	1	-2.5	2.5	7.3
CG13841 /// CG4000	CG13841 /// CG4000	CG13841				2.4	8.5	3.2	2.7	4.9
CG17738	CG17738	CG17738			+	2.3	1.3	1	1.3	11.5
CG7294	CG7294	CG7294				2.2	2.2	1.1	1.9	10.2
CG16704	CG16704	CG16704				2	-1	-2.7	2.7	8.7

REPRESSED

105

STRESS RESPONSE/DETOXIFICATION/ROS

Stress-detoxification

Glutathione S transferase D7	GstD7	CG4371	+			-5.4	-11.6	-4.3	-2.7	10
Glutathione S transferase D6	GstD6	CG4423				-4.2	-7.6	-3	-2.5	7.4
Glutathione S transferase D4	GstD4	CG11512			+	-2.2	-2.6	-1.7	-1.6	5
Cyp4s3	Cyp4s3	CG9081	+			-2	-2	-2.3	1.2	5.6

Oxydoreduction

Sorbitol dehydrogenase like	Sodh-1	CG1982	+		-	-2.2	-1.8	-1.7	-1	6.5
AOP2-related /// peroxiredoxin 2540	CG12896 /// Prx2540-1 /// -2	CG11765				-2.1	-3.4	-2	-1.7	8.2
CG2065	CG2065	CG2065			+	-2	-1.6	-1.2	-1.3	9.1
CG3699	CG3699	CG3699			-	-4	-2.8	1.2	-3.2	8.8

CG31559	CG31559	CG31559	+					-2.8	-3.5	-5.5	1.6	10.1
CHITIN/CUTICLE												
Chitin binding protein/cuticle												
chitin-binding peritrophin-A	Cht5	CG9307	+					-7.6	-6.5	-3.7	-1.8	10.2
Dm-peritrophin-15b	Peritrophin-15b	CG31893						-2.6	-2	-1.3	-1.5	6.4
Acp65Aa	Acp65Aa	CG10297						-5	-1.7	5.3	-8.9	9.7
CG1259	Cpr64Ad	CG1259	+					-4	-11.3	-6.2	-1.8	12.3
Ecdysone-dependent gene 78E	Edg78E	CG7673	+					-2.7	-2.3	-1.8	-1.3	5.2
CG15021	CG15021	CG15021	-					-2.3	-3.8	-2.9	-1.3	9
CG32404	Cpr65Aw	CG32404						-2.3	-2.2	2.7	-5.7	9.8
Lcp65Af	Lcp65Af	CG10533						-2.2	-18.2	-1.8	-9.9	13.2
CG14880	CG14880	CG14880	+					-2.1	-1.7	-2.8	1.6	6.9
Lcp65Ad	Lcp65Ad	CG6955						-2.1	-2.6	1.7	-4.5	7.3
CG12009	CG12009	CG12009						-2.6	-2.1	-1.2	-1.7	7.4
cuticle cluster 8 /// cuticle cluster 7	Ccp84Aa /// Ccp84Ab	CG2360						-4.2	-9	-1.5	-5.8	11.7
CG14643	TwdlG	CG14643						-2.4	-5.3	-3	-1.8	9.3
GCR(ich)	TwdlT	CG5812						-2.8	-3	-1.1	-2.8	9.6
CG5468	TwdlM	CG5468	+					-3.2	-4.1	-2.8	-1.4	8
CG6452	TwdlO	CG6452	+					-4.4	-13.9	-9.5	-1.5	11.7
CG14534	TwdlE	CG14534	+					-5.1	-9.6	-8.2	-1.2	7
CG14240	TwdlP	CG14240	+					-5.8	-2	1.5	-3	10.9
CG5476	TwdlN	CG5476	+					-7.9	-7	-2.1	-3.3	10.4
PEPTIDASE&INHIBITOR												
Serine protease												
CG5255	CG5255	CG5255	+					-3.4	-3.5	-2.7	-1.3	5.9
CG31728	CG31728	CG31728						-2.7	-2.5	-1.8	-1.4	9.7
CG32808	CG32808	CG32808	+					-2.1	-1.4	-1.4	-1	7.7
CG31954	CG31954	CG31954						-2	-2	-1.7	-1.2	6.7
serine protease inhibitor												
Serine protease inhibitor 1	Spn43Aa	CG12172	+					-2.5	-2.1	-1.9	-1.1	5.3
CG1342	CG1342	CG1342						-2.6	-3.7	-2.1	-1.7	6.5
Serine protease inhibitor 1	Spn43Aa	CG12172	+					-2.5	-2.1	-1.9	-1.1	5.3
CG3604	CG3604	CG3604	+	+	+			-3.1	-3.7	-4.2	1.1	11.6
Other peptidase												
CG3502	CG3502	CG3502	+					-4.6	-7	-3.7	-1.9	8.7
CG8560 /// ---	CG8560 /// DsecCG8560	CG8560	-					-3.4	-4.2	-1.4	-3	9.2
CG8773	CG8773	CG8773	-					-2	1.1	1.2	-1.1	5.4
CG10280	CG10280	CG10280						-2.7	-1.5	1	-1.5	5.9
CG4017	CG4017	CG4017	+					-2.7	-3	-2.6	-1.2	6.4
METABOLISM/TRANSPORTERS												
Metabolism												
CG7529	CG7529	CG7529	+					-2.7	-1.4	-1.6	1.2	6.3
CG12480	CG12480	CG12480	+					-2.2	-5.3	-6.1	1.2	8.5
CG3940	CG3940	CG3940	-	+				-2.2	-3.2	-1.3	-2.4	10.5
SP1029	SP1029	CG11956						-2.1	-1	1.2	-1.2	10.2
CG8112	CG8112	CG8112						-2	-2.5	-2.5	-1	10.5
MISCELLANEOUS												
Neuronal acitivity-neuropeptide												
Neuropeptide like precursor protein 1	Nplp1	CG3441	+					-2.5	-4.9	-4.3	-1.1	6.1
Odorant-binding protein 99d	Obp99d	CG15505	+					-2.4	-3	-10.3	3.4	9.8
syntaxin	Syx4	CG2715	+					-2.2	-3.4	-3.8	1.1	6.8
Ptc-related Disp-like	Ptr	CG11212	+					-2.1	-1.6	-1.6	1	8.6
Metal ion binding												
metallothionein N	MtnA	CG9470	+					-4.3	1.9	3.6	-1.9	8.9
Metallothionein B	MtnB	CG4312						-2.2	-2.2	-1.7	-1.3	4.8
Various												
CG6164	Npc2f	CG6164	-	-	-			-2	-2.8	-1.9	-1.4	5.5
GV1	GV1	CG12023						-2.2	-1.6	1.1	-1.7	11.3
windbeutel	wbl	CG7225						-2.4	-2	-1.1	-1.8	9.5
UNKNOWN												
Unknown												
CG13679	CG13679	CG13679	+					-23.7	-116	-28	-4.1	12.6
CG14568	CG14568	CG14568	+					-15	-26.4	-12.4	-2.1	9.7
CG14569	CG14569	CG14569	+					-12	-38.8	-14.9	-2.6	10.5
CG14573	CG14573	CG14573	+					-7.2	-8	-3.6	-2.2	9.1
Osiris	Osi19	CG15189	+					-5.8	-10.7	-4.4	-2.5	8.7
CG11345	CG11345	CG11345	+					-5.6	-5.6	-3.2	-1.8	11.1
CG14457	CG14457	CG14457	+					-5.5	-2.8	-1.4	-1.9	7.4
CG14564	CG14564	CG14564	+					-5.3	-7.3	-6.3	-1.2	10.4
CG6908	CG6908	CG6908	+					-4.7	-6.3	-6	-1	8.2
CG13059	CG13059	CG13059	+					-4.5	-12.2	-6.7	-1.8	11.2
CG13047	CG13047	CG13047	+					-4.4	-6.5	-2.2	-2.9	13.2
CG14565	CG14565	CG14565	+					-4.3	-7.8	-9.6	1.2	9.8
CG14457	CG14457	CG14457	+					-3.8	-2.3	-1.4	-1.7	6.5
CG11382	CG11382	CG11382	+					-3.6	-5.1	-3.9	-1.3	7.7
CG15226	CG15226	CG15226	+					-3.6	-5	1.9	-9.4	8.2
CG11413	CG11413	CG11413	+					-3.3	-17.5	-5.9	-3	11.5
CG13239	CG13239	CG13239	+					-3.3	-5.8	-4.3	-1.3	8
CG13082	CG13082	CG13082	+					-2.9	-2.7	-2.5	-1.1	9.3
CG30458	CG30458	CG30458	+					-2.9	-3	-1.5	-2	9.7

CG14566	CG14566	CG14566		-2.8	-4.4	-1.7	-2.6	11.3	
CG31606	CG31606	CG31606	+	-2.7	-2.6	-2.1	-1.2	5.1	
CG14456	CG14456	CG14456		-2.6	-4.2	-2.6	-1.6	10.7	
CG13046	CG13046	CG13046		-2.4	-1.6	-1.2	-1.4	10.2	
CG1499	CG1499	CG1499		-2.4	1.6	3.9	-2.5	5.9	
CG2150	CG2150	CG2150	+	-2.4	-3	-2.7	-1.1	6.2	
CG15225	CG15225	CG15225		-2.2	-2.1	3.8	-8.1	7.1	
CG11585	CG11585	CG11585		-2	-6.4	-4.2	-1.5	11.9	
CG32512	CG32512	CG32512		-2.1	-2.4	-1.4	-1.7	7.6	
SCP-containing protein A /// B /// C	scpr-A /// scpr-B /// scpr-C	CG5207		-2.1	-2.1	-1.1	-1.9	5.9	
Unknown small peptide									
CG13041	CG13041	CG13041		-11.2	-38.1	-3.7	-10.3	9.5	
CG13066	CG13066	CG13066	+	-9.1	-16	-7.7	-2.1	12.1	
CG14324	CG14324	CG14324	+	-9.1	-8.7	-7	-1.3	7.2	
CG17290	CG17290	CG17290	+	-7.2	-15.2	-7.2	-2.1	10.7	
CG13060	CG13060	CG13060	+	-6.6	-24	-8	-3	8.3	
825-Oak /// CG32213	825-Oak /// CG32213	CG32214	+	-6.4	-5.6	-3.2	-1.7	8.4	
CG30334	CG30334	CG30334	+	-6.3	-40.5	-35.7	-1.1	10.7	
CG13394 /// GA12253	CG13394 /// DpseGA25454	CG13394	+	-6.1	-6.9	-6.5	-1.1	7.4	
CG13227	CG13227	CG13227	+	-5.6	-6	-2.7	-2.2	9	
CG15212	CG15212	CG15212	+	-5.5	-8.6	-6	-1.4	8.3	
CG34280	CG34281	CG14328	+	-4.7	-19.7	-8.9	-2.2	10.9	
CG13069	CG13069	CG13069		-4.6	-21.1	-5.3	-4	13.7	
CG8012	CG8012	CG8012		-4.6	-1.1	2.1	-2.4	11.4	
CG14096	CG14096	CG14096	+	-4.6	-6.8	-3.8	-1.8	9.3	
CG15213	CG15213	CG15213		-2.7	-12.3	-7.3	-1.7	11.1	
CG2444	CG2444	CG2444		-2.6	-2.7	-1.9	-1.4	7.2	
CG34248	CG34248	CG34248		-2.6	-3.8	-2.7	-1.4	9.8	
CG34267	CG34267	CG34267		-2.5	-7.1	-4.8	-1.5	10.9	
CG12546 /// CG14452	CG12546 /// CG14452	CG14452		-2.4	-2.4	-1.8	-1.3	5.1	
CG18628	CG18628	CG18628		-2.2	-2	-1.7	-1.2	4.7	
CG32266	CG32266	CG32266		-2	-2.2	-2.1	-1.1	13	



C. A role for PGRP-LA in the salivary glands ?

In the work presented in the manuscript, we focused our attention on the tracheae, where *PGRP-LA* is highly expressed. We also tested the possible involvement of PGRP-LA in two other tissues, the eyes and the salivary glands. Concerning the eyes, we performed some « ocular infections », depositing a drop of *Ecc15* bacterial pellet on the eye. We did not find any reproducible effect in the *PGRP-LA*^{2A} mutant on AMP gene expression or fly survival.

We also analyzed the expression of a *Drosomyacin*-GFP reporter gene in the salivary glands after natural infection with *Ecc15*. Interestingly, the proportion of fluorescent salivary glands was lower in *PGRP-LA*^{2A} mutant than in the wild-type. More precisely, we observed strongly fluorescent salivary glands in 7 larvae out of 20 in the control strain and in only 1 larva out of 20 in the *PGRP-LA*^{2A} mutant (Figure 12 A,B). This quantification was done on a random sample of 3rd instar larvae of the same size. Although this number of larvae is too small to draw any conclusions, the experiment was repeated several times, just observing larvae in the vial without counting them, with similar results. We did not observe any intermediate levels of fluorescence in the larvae, suggesting that *Drosomyacin* induction in the salivary glands relies on an all or nothing response. We also noticed that the salivary glands were smaller in *PGRP-LA*^{2A} larvae compared to the wild type but we have not yet performed any quantitative analysis of this trait.

We also analyzed the expression of a *Defensin*-GFP reporter gene in wild-type and *PGRP-LA*^{2A} mutant third instar larvae. 30 hours after natural infection with *Ecc15*, we observed a weak fluorescence in part of the fat body attached to the salivary glands, in half of the control larvae (Figure 12 C,D). In contrast, both the proportion of fluorescent larvae and the intensity of the fluorescence were lower in *PGRP-LA*^{2A} mutant. Here again, although the quantitative results presented in Figure 12C involve a very small number of larvae, they are representative of 3 further independent, but unquantified, observations.

Taken together, our results suggest a role for PGRP-LA in the induction of *Drosomyacin* in the salivary glands and of *Defensin* in the fat body surrounding the salivary glands. Nevertheless, these results need to be confirmed by further quantification and, as discussed before, using other strains, especially other mutants of *PGRP-LA*.

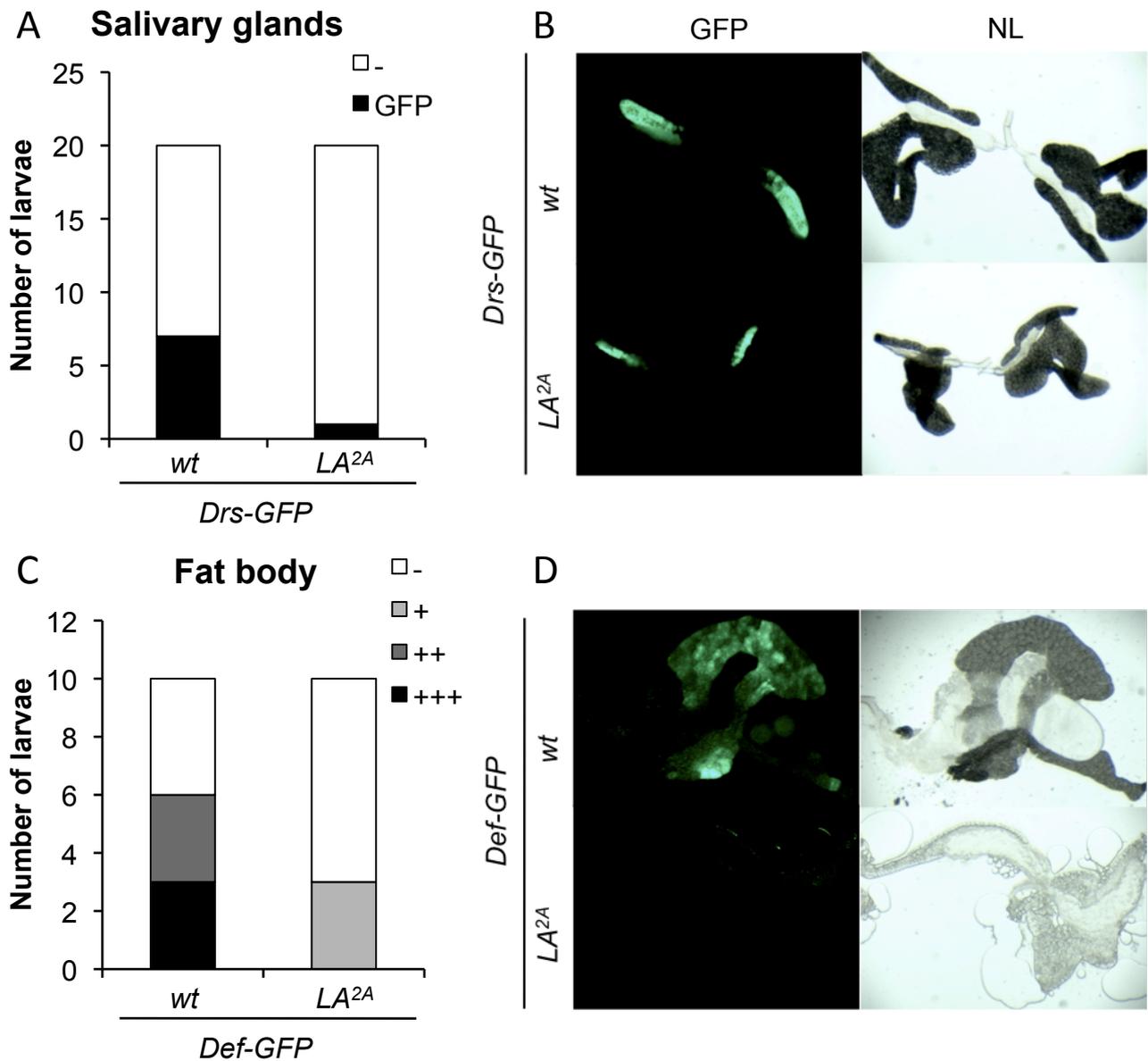


Figure 12: Analysis of the effect of LA^{2A} mutation in the region of the salivary glands

A,B. Fluorescence in the salivary glands of Drs-GFP and Drs-GFP; LA^{2A} larvae, 2 days after natural infection with *Ecc15* at 18°C. **C,D.** Fluorescence in the fat body surrounding the salivary glands 30h after natural infection with *Ecc15* at 22°C. Quantification (A, C) and observation of representative examples of fluorescent samples (B, D).

Discussion

Mes deux projets de thèse concernent d'une part la caractérisation d'un nouveau mode d'infection par voie génitale, et de l'autre l'étude fonctionnelle du gène *PGRP-LA*. S'ils sont relativement indépendants, les informations qui s'en dégagent concernent cependant des facettes similaires de la réponse immunitaire de la *Drosophile*. Ces deux projets apportent en effet des informations sur la régulation de l'expression de gènes dans les épithélia suite aux infections locales et sur les dialogues entre épithélia barrières et corps gras. Par ailleurs, la caractérisation fonctionnelle de *PGRP-LA* s'inscrit dans la lignée de l'étude des *PGRP* de *Drosophile*.

III. La régulation épithéliale des gènes encodant les AMP

A. En absence d'infection

1) La production constitutive de la Cécropine dans le canal éjaculateur

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à l'expression basale des AMP dans le canal éjaculateur et les trachées. Dans le canal éjaculateur, l'expression constitutive des gènes codant l'Andropine et la Cécropine était déjà connue (Samakovlis et al., 1991b; Tzou et al., 2000). Nos résultats de RT-qPCR et d'observation du rapporteur Cécropine-GFP corroborent ces observations. Cette expression ne dépend pas des voies Toll et Imd mais est sous le contrôle des facteurs de transcription Caudal et Drifter/Ventral veins lacking (vvl) (Junell et al., 2010; Ryu et al., 2004). En effet, une délétion de la région proximale du promoteur de la CécropineA1, qui contient de sites R1, κ B et GATA, n'altère pas l'expression du gène dans le canal éjaculateur (Junell et al., 2010). En revanche, cette expression est abolie par des mutations ciblées sur des séquences cis-régulatrices de liaison de Caudal ou vvl situées environ 400 nucléotides en amont du gène (Junell et al., 2010; Ryu et al., 2004). Des sites de fixation de Caudal et vvl ont également été identifiés dans d'autres promoteurs de gènes encodant des AMP, ce qui suggère une implication plus générale de ces facteurs de transcription

dans l'expression constitutive des AMP (Junell et al., 2010; Ryu et al., 2004). Par exemple, il a été mis en évidence que Caudal est requis pour l'expression constitutive de la *Drosomyicine* dans les glandes salivaires chez l'adulte, mais pas dans l'appareil génital femelle (Ryu et al., 2004). De plus, une co-expression de Caudal et vvl en cellules mbn-2 révèle que les deux facteurs de transcription agissent en synergie dans l'expression de la Cécropine (Junell et al., 2010). Notons que Caudal a également un effet inhibiteur sur l'expression des AMP par Relish dans l'intestin (Ryu et al., 2008). Ainsi, l'expression constitutive des AMP est régulée par les facteurs de transcriptions Caudal et vvl de façon différentielle selon les tissus ou les régions d'un même tissu.

2) La production basale des AMP dans les trachées

Dans les trachées, un niveau d'expression faible mais significatif des gènes codant certains AMP, en particulier la *Défensine*, est observée en absence d'infection. Cette expression dite basale est abolie dans le mutant Relish, indiquant qu'elle est placée sous le contrôle de la voie Imd. Elle est également fortement réduite chez un mutant déficient pour *PGRP-LA*, ce qui suggère un rôle de ce PGRP dans le maintien d'un niveau basal d'expression. Il est plausible que l'isoforme PGRP-LA_D, ayant un domaine RHIM, participe à l'induction de cette voie. D'un côté, comme cette isoforme n'a pas de domaine PGRP, on peut faire l'hypothèse que PGRP-LA_D induit la voie Imd de façon constitutive à un niveau très faible, dans les tissus où il est exprimé fortement. De l'autre côté, PGRP-LA_D pourrait interagir avec d'autres isoformes de PGRP-LA ou avec un autre PGRP, notamment PGRP-LC ou PGRP-LE, et induire un niveau basal de la voie Imd en réponse à la flore. L'expression basale des AMP étant également affectée chez un mutant *PGRP-LC*, on peut privilégier l'hypothèse selon laquelle PGRP-LA sensibiliserait PGRP-LC à un taux faible de peptidoglycane, favorisant une réponse basale à la flore dans les tissus où il est exprimé.

Cependant, le mutant que nous avons utilisé dans l'étude de la fonction de PGRP-LA correspond à la délétion des 4 derniers exons du gène, mais les 2 premiers n'ont pas été délévés. La région du domaine RHIM est conservée chez le mutant et pourrait éventuellement agir comme un dominant négatif sur PGRP-LC. Il sera important de vérifier le phénotype observé en utilisant un mutant nul de *PGRP-LA*.

La réponse épithéliale est hautement régulée et plusieurs études ont mis en évidence l'implication de régulateurs négatifs dans l'ajustement précis du niveau de réponse épithéliale à la charge bactérienne (Aggarwal et al., 2008; Kleino et

al., 2008; Lhocine et al., 2008; Ryu et al., 2008; Zaidman-Remy et al., 2006). De plus, il a été démontré qu'un contrôle adéquat de l'expression intestinale des AMP permet de maintenir un équilibre entre diverses espèces de la communauté microbienne dont les plus pathogènes sont présentes en très faible proportion (Ryu et al., 2008). Un niveau trop élevé d'activation de la réponse est néfaste pour la mouche car il rompt cet équilibre, mais on peut supposer qu'inversement, le maintien d'un certain niveau d'immunité basale lui est bénéfique, comme cela a été proposé chez *Aedes aegypti* (Bian et al., 2010). En effet, la présence de *Wolbachia* rend ce moustique résistant à certains virus tels que celui de la Dengue (Bian et al., 2010) et serait corrélée à un niveau élevé d'immunité basale (en absence de repas sanguin). En particulier, une induction de la voie Toll a été rapportée en présence de l'endosymbionte, comme le révèle l'induction de plusieurs gènes cibles dont la *Défensine*, exprimée 17 fois plus fortement qu'en absence de *Wolbachia* (Bian et al., 2010). Comme la voie Toll intervient également dans la réponse à l'infection par le virus de la Dengue (Xi et al., 2008), il a été proposé que l'augmentation de l'immunité basale confère la résistance à ce virus (Bian et al., 2010).

B. Induite par l'infection

Au cours de ces deux projets, nous avons également obtenu des informations sur l'expression des AMP induite par l'infection dans les épithélia du canal éjaculateur chez le mâle, des trachées et des glandes salivaires chez la larve. Nous avons en particulier mené une analyse globale du transcriptome dans les trachées après infection naturelle par *Ecc15*.

1) Dans les trachées

a) La réponse immunitaire dans les trachées: un nouveau mode d'infection

Une étude transcriptomique de la réponse immunitaire dans les trachées à l'aide de puces à ADN a été publiée récemment par le laboratoire de Thomas Roeder (Wagner et al., 2009). Cependant, nous avons choisi d'en faire une nouvelle pour deux raisons principales. D'une part, l'étude de C. Wagner et al était incomplète car leurs puces ne permettaient d'analyser qu'une fraction du génome. D'autre part, nous étions intéressés par l'analyse de la réponse dans les trachées chez un mutant *Relish* pour étudier l'implication de la voie Imd et chez

un mutant *PGRP-LA* pour identifier le rôle de ce PGRP dans la réponse trachéenne. Nous avons eu besoin de modifier le protocole expérimental utilisé par C. Wagner et al, impliquant de sélectionner les larves exprimant fortement la Drosomycine dans les trachées (Wagner et al., 2009), et donc impropre à la comparaison de plusieurs génotypes. Comme leur mode d'infection des larves induit un niveau très variable entre les individus, nous avons mis au point une méthode d'infection induisant une réponse plus homogène. Nous avons donc infecté les larves selon la méthode décrite par B. Charroux et J. Royet (Charroux and Royet, 2009), déposant directement le culot bactérien dans le milieu de développement des larves. Cette méthode induit une réponse légèrement plus faible mais plus homogène entre les larves.

b) *Induction des gènes codant les AMP sous le contrôle de la voie Imd*

C. Wagner et al rapportent une induction significative de la *Drosomycine*, la *Metchnikowine*, la *Drosocine* et la *Défensine* dans les trachées alors que l'*Attacine*, la *Cécropine* et la *Diptéricine* ne sont pas significativement induites (Wagner et al., 2009). Nos données révèlent également une induction par *Ecc15* de ces quatre gènes ainsi que de 3 Attacines (*AttA*, *C*, *D*), d'une Cécropine (*CecC*) et d'une Diptéricine (*DptB*), mais pas celle de la *Diptéricine* (*Dpt*). La *Cécropine A* n'a pu être testée car les sondes correspondant à ce gène sont absentes de la puce Affymetrix. Ces données concordent relativement bien, mais il est intéressant de noter que les niveaux d'induction diffèrent beaucoup dans ces deux études. En particulier, la *Drosomycine* est le gène d'AMP présentant la plus forte induction dans les résultats de Wagner et al, alors que nos résultats révèlent une induction maximale pour la *Metchnikowine* (Wagner et al., 2009). Cette différence est probablement liée au biais introduit par le tri des larves selon l'expression du rapporteur Drosomycine-GFP (Wagner et al., 2009).

Selon nos données, les gènes des AMP induits dans les trachées sont tous sous le contrôle de la voie Imd. Ces résultats sont dans la continuité d'études précédentes ayant mis en évidence que l'induction de la *Drosomycine* dans les trachées était sous le contrôle de la voie Imd et que certains composants de la voie Toll ne sont pas exprimés dans les trachées (Tzou et al., 2000; Wagner et al., 2009).

Nous avons notamment remarqué l'induction de la *Listéricine*, encodant un AMP actif contre les bactéries à peptidoglycane de type DAP telles que *L. monocytogenes* et *E. coli* (Goto et al., 2010). Selon une étude récente, l'expression de la *Listéricine* (CG9080) est induite dans les cellules S2 sous contrôle coopératif de PGRP-LE et de la voie JAK-STAT (Goto et al., 2010).

Nos données, comme celles de De Gregorio (réponse systémique) et Buchon (réponse intestinale), confirment le fort niveau d'induction de ce gène (Buchon et al., 2009b; De Gregorio et al., 2002). Nous notons cependant que l'expression de ce gène est totalement abolie chez le mutant *Relish* et qu'aucun des gènes cibles de la voie JAK-STAT (*upd3*, *socs36E*) n'est surexprimé dans les trachées après infection par *Ecc15*. Ces résultats suggèrent que la *Listéricine* n'est induite dans les trachées que sous contrôle de la voie Imd. Cela pourrait cependant être vérifié en utilisant un RNAi ciblant un gène de la voie JAK-STAT.

2) Dans l'appareil génital

Dans l'appareil génital, nous avons mis en évidence pour la première fois l'induction d'une réponse immunitaire à l'infection dans le tractus génital : la *Défensine* et la *Diptéricine* sont induites dans le canal éjaculateur sous le contrôle de la voie Imd. En effet, la seule expression inductible d'AMP connue au niveau de l'appareil génital était celle de l'Andropine en réponse à l'accouplement, mais ses voies de signalisation n'ont pas encore été caractérisées (Samakovlis et al., 1991a). Chez les femelles, une induction de la réponse immunitaire en réponse à l'accouplement a également été décrite. Elle dépendrait des voies Toll et Imd et serait induite par reconnaissance du « sex peptide », produit par le mâle et transféré à la femelle lors de l'accouplement (Peng et al., 2005). Cependant, la localisation de cette réponse n'a pas été mise en évidence ; elle pourrait donc être épithéliale ou systémique. Il serait intéressant d'étudier si la réponse antimicrobienne à l'accouplement chez le mâle est liée à la présence de bactéries lors de l'accouplement ou à la reconnaissance de molécules sécrétées par la femelle. Les auteurs rapportant l'induction de l'Andropine ont cependant observé que cet AMP n'est pas induit après infection systémique, ce qui favorise le modèle d'une réponse directe à l'accouplement (Samakovlis et al., 1991a). Selon ces auteurs, l'Andropine présente dans le canal éjaculateur est transférée chez la femelle lors de l'accouplement et l'induction permet de reconstituer son niveau initial.

3) Dans les glandes salivaires

Nous avons observé que les glandes salivaires de larves exprimaient la *Drosomycine* après infection orale par *Ecc15* et que cette expression était altérée chez le mutant *PGRP-LA*. Une étude récente rapporte cependant que la *Drosomycine* n'est pas induite mais réprimée dans ce tissu après infection

(Abdelsadik and Roeder, 2010). Par ailleurs, nous avons observé que les glandes salivaires étaient plus petites dans les larves du mutant *PGRP-LA* que dans celles de la lignée sauvage. Or ce phénotype a été rapporté après induction chronique de la voie Imd dans les glandes salivaires, ce qui serait contradictoire avec nos observations (Abdelsadik and Roeder, 2010). Bien que nos résultats proviennent de plusieurs expériences indépendantes, il sera nécessaire de les reproduire dans plusieurs contextes génétiques avant d'en tirer les conclusions.

4) Les dénominateurs communs de la réponse épithéliale

Nous avons observé que l'expression inductible des gènes codant les AMP est sous le contrôle de la voie Imd à la fois dans l'appareil génital que dans les trachées. Cela avait déjà été mis en évidence dans plusieurs épithélia : l'organe antenno-maxillaire de la larve, les glandes labellaires et les tubules de Malpighi de l'adulte, l'intestin et les trachées de la larve et de l'adulte (Tzou et al., 2000). Nos résultats ajoutent donc l'appareil génital mâle à cette liste de réponses épithéliales, toutes Imd-dépendantes.

La Défensine se révèle être particulièrement impliquée dans la réponse épithéliale. Elle est induite dans les trachées, l'appareil génital et l'intestin sous le contrôle de la voie Imd (Buchon et al., 2009b), ainsi que dans le corps gras sous le contrôle des voies Imd et Toll (De Gregorio et al., 2002; Lemaitre et al., 1996). La production de la Défensine en réponse à des infections par des bactéries à Gram-négatif peut paraître surprenante car cet AMP est communément admis comme ayant une activité spécifique contre les germes à Gram-positif. Une activité contre *M. luteus* a effectivement été rapportée (Cociancich et al., 1993), mais il semble difficile de trouver des sources bibliographiques directes quant à la spécificité d'action de cet AMP chez la Drosophile contre les bactéries à Gram-positif et non à Gram-négatif. Les références remontent en effet soit à une communication personnelle (Rutschmann et al., 2002), soit à une étude réalisée sur une défensine de Coléoptère, montrant une activité contre 4 souches de bactéries à Gram-positif parmi 12 testées et 1 souche de bactéries à Gram-négatif parmi 4 testées (Bulet et al., 1991).

C. Une régulation tissulaire fine

L'expression des AMP est finement régulée en fonction des conditions d'infections et des tissus. Dans le corps gras, il n'a pas été rapporté d'expression constitutive de gènes codant des AMP. L'induction de ces gènes y est dépendante

de la voie Imd, induite par le peptidoglycane de type DAP, et de la voie Toll, induite par le peptidoglycane de type Lys et le β -glucane des champignons ou par la détection de protéases. Dans les épithélia, l'expression des gènes codant les AMP diffère en fonction des tissus : il n'y a pas une immunité épithéliale, mais des immunités épithéliales variées.

On remarque d'une part une variabilité dans l'expression constitutive de ces gènes : par exemple, les glandes salivaires de l'adulte expriment la Drosomyicine alors que le canal éjaculateur exprime la Cécropine (Tzou et al., 2000). Comme nous l'avons mentionné précédemment, les facteurs de transcription contrôlant cette expression constitutive diffèrent selon les tissus, Caudal étant en particulier requis pour l'expression constitutive de la Drosomyicine dans les glandes salivaires mais pas dans l'appareil génital (Ryu et al., 2004).

D'autre part, on peut noter des différences majeures dans l'expression inductible des AMP selon les tissus. En effet, la Cécropine C et l'Attacine C sont induites dans les trachées, alors qu'elles ne le sont pas dans l'intestin (Buchon et al., 2009b). Inversement, les Drosomyicines 2, 3 et 4 sont induites dans l'intestin mais pas dans les trachées après infection (Buchon et al., 2009b). De plus, la réponse antimicrobienne à l'infection, dans les trachées et les glandes salivaires, est bien différente de l'expression des gènes codant les AMP après induction artificielle de la voie Imd, ce qui a été mis en évidence dans deux études publiées par le laboratoire de T. Roeder (Abdelsadik and Roeder, 2010; Wagner et al., 2009). Selon ces auteurs, l'induction artificielle de la voie Imd par surexpression de *PGRP-LC* dans les glandes salivaires ou de *PGRP-LE* dans les trachées aboutit à l'expression de tous les gènes testés codant diverses familles d'AMP⁶ alors que l'infection induit préférentiellement certains AMP de façon tissu-dépendante (Abdelsadik and Roeder, 2010; Wagner et al., 2009).

Enfin, il a été mis en évidence que des stimuli autres que l'infection induisaient une réponse antimicrobienne : c'est notamment le cas de l'accouplement, induisant l'Andropine localement chez le mâle et la Metchnikowine chez la femelle, et du jeûne qui stimulerait l'expression de la *Drosomyicine* chez les larves (Becker et al., 2010; Peng et al., 2005; Samakovlis et al., 1991a). Ces réponses sont bien plus faibles que celles induites par infection et leur induction est en partie indépendante des voies Toll et Imd. En effet, il a été mis en évidence que l'expression de la Drosomyicine répondait au moins

⁶ Des gènes codant les sept familles d'AMP sont testés dans l'étude des trachées, alors que celle des glandes salivaires n'inclut pas l'Attacine

partiellement au facteur de transcription FOXO, lors du jeûne (Becker et al., 2010).

Le contrôle des gènes codant les AMP est donc très complexe et dépend des tissus et des conditions de vie de l'individu. Après avoir étudié les voies majeures d'induction de ces gènes après infection, une caractérisation plus fine du contrôle de leur expression est en cours, notamment par dissection précise de leurs promoteurs (Becker et al., 2010; Junell et al., 2010; Ryu et al., 2004). D'une façon générale, ces promoteurs contiennent une région proximale contenant à la fois des sites de fixation pour des facteurs de transcription inductibles et des sites de fixation pour des éléments GATA, qui déterminerait la spécificité d'expression tissulaire (revu dans (Uvell and Engstrom, 2007)). La partie plus distale de ces promoteurs contient des sites de fixation pour des facteurs de transcription qui permet l'expression constitutive et pourrait moduler l'intensité de l'expression induite par la présence de bactéries (revu dans (Uvell and Engstrom, 2007)). En particulier, comme le promoteur de la Diptéricine contient des sites de fixation à vvl, la forte expression de cet AMP dans le cardia en réponse à la flore pourrait être liée à la présence de vvl (Junell et al., 2010) (Welchman, non publié). Ainsi, l'induction des AMP se fait bien sous le contrôle de la voie Imd dans les épithélia, mais elle est modulée de façon tissu-spécifique par d'autres facteurs de transcription.

IV. Une analyse globale de la réponse immunitaire trachéenne

A. Induction de gènes impliqués dans l'immunité et la détoxification

Notre analyse globale du transcriptome trachéen révèle que l'infection par *Ecc15* module l'expression d'environ 200 gènes, en plus des AMP. Parmi les gènes induits par l'infection, certains sont connus pour être impliqués dans la réponse immunitaire de la *Drosophile*. C'est le cas de cinq gènes encodant des PGRP, *PGRP-SD*, *SB1*, *LF*, *LB* et *SA*, lesquels sont également induits dans l'intestin après infection orale et dans le corps gras après infection systémique (Buchon et al., 2009b; De Gregorio et al., 2001). *PGRP-LA* est également induit de façon significative mais son facteur d'induction est de 1,9, donc en dessous du seuil 2 que nous avons choisi pour n'étudier que les gènes fortement régulés. Les PGRP induits dans les trachées après infection appartiennent à des classes fonctionnelles

diverses. En effet, PGRP-SA et SD sont des protéines impliquées dans la reconnaissance du peptidoglycane en amont de la voie Toll, PGRP-LB et LF sont des régulateurs négatifs de la voie Imd et PGRP-SB1 a été proposé comme effecteur antimicrobien (Bischoff et al., 2004; Leone et al., 2008; Mellroth and Steiner, 2006; Michel et al., 2001; Zaidman-Remy et al., 2006). On peut cependant noter que PGRP-SC1A/B, qui est induit après infection dans l'intestin, n'est pas induit par l'infection dans les trachées (Buchon et al., 2009b). Ceci concorde avec les données de FlyAtlas, selon lesquelles PGRP-SC1a/b est spécifiquement exprimé dans l'intestin moyen (Chintapalli et al., 2007). Deux gènes encodant des composants de la voie Imd sont également induits : le facteur de transcription Relish, et le régulateur négatif pirk (Dushay et al., 1996; Lhocine et al., 2008).

Les gènes TepI et TepII (ThioEster containing Proteins) sont également induits dans les trachées après infection. L'induction de ces gènes a déjà été rapportée après infection septique chez l'adulte, mais leur fonction chez la Drosophile n'a pas encore été élucidée (Bou-Aoun, 2008). Par contre, un de leurs homologues chez *Anopheles gambiae*, Tep1, est impliqué dans la défense contre le parasite *Plasmodium berghei* et agirait dans l'hémolymphe d'une façon analogue au complément des Mammifères (Blandin et al., 2004). Ce gène est très variable entre les différentes souches d'*A. gambiae* et il a été rapporté que ce polymorphisme serait lié à la variabilité de résistance de ces moustiques à *P. berghei* (Blandin et al., 2009).

La régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'immunité apporte un niveau de contrôle supplémentaire à la régulation de la réponse antimicrobienne. Parmi les gènes induits qui ne sont pas directement liés à la réponse immunitaire, plusieurs gènes sont impliqués dans la réponse au stress et la détoxification des réactifs oxygénés. C'est également le cas dans l'intestin après infection orale, mais les gènes régulés dans ces deux tissus sont très différents (Buchon et al., 2009b). Cette différence pourrait être liée à la fonction respiratoire des trachées, impliquant une gestion particulière de l'oxygène.

B. Répression de gènes encodant des protéines cuticulaires

Nos données révèlent que l'infection provoque la répression de 105 gènes, dont 19 codent des protéines cuticulaires révélées ou putatives. En particulier, 7 gènes réprimés appartiennent à la famille des *Tweedle*, qui contient 27 membres chez la Drosophile (Guan et al., 2006). Les deux seuls membres de cette famille étudiés jusqu'à présent, *TweedleD* et *TweedleA*, sont impliqués dans la structure

de la cuticule (Guan et al., 2006). Leur mutation provoque une modification de la morphologie des individus, notamment du rapport entre longueur et largeur des larves et des pupes (Guan et al., 2006). En particulier, une mutation dans *TweedleA* serait responsable du phénotype Tubby (Guan et al., 2006). Les gènes de la famille *Tweedle* sont en général exprimés dans des régions dérivées de l'ectoderme embryonnaire, en particulier dans la carcasse larvaire (Chintapalli et al., 2007), et le gène *Tweedle β* est très enrichi dans les trachées, mais pas réprimé lors de l'infection selon nos résultats (Chintapalli et al., 2007). Selon nos données, les gènes *Tweedle* réprimés par l'infection ont un niveau général d'expression élevé dans les trachées par rapport aux autres gènes. Ces gènes ne sont cependant pas enrichis dans les trachées par rapport aux autres tissus selon Flyatlas (Chintapalli et al., 2007). Cependant, la protéine TweedleD est détectable par immunolocalisation dans les trachées alors que l'ARN de ce gène n'est pas spécialement enrichi dans ce tissu (Chintapalli et al., 2007; Guan et al., 2006). La répression d'un nombre élevé de ces protéines cuticulaires après l'infection est intrigante. Elle suggère un remodelage de la cuticule dans les trachées lors de l'infection, ce qui peut être en relation avec l'épaississement observé précédemment au niveau des cellules épithéliales trachéennes induisant une forte réponse immunitaire (Wagner et al., 2009).

V. Les dialogues entre épithélia barrières et corps gras

A. Le dialogue tractus génital-corps gras

Les résultats obtenus pendant ma thèse ont apporté des informations sur le dialogue entre deux épithélia et le corps gras : le tractus génital et les glandes salivaires. Concernant l'appareil génital, nous avons pu montrer que la cytotoxine trachéenne déposée sur la plaque génitale était détectable dans l'hémolymphe 2h plus tard. De plus, l'inactivation de *PGRP-LC* par interférence ARN dans le corps gras et les hémocytes est suffisante pour bloquer la réponse antimicrobienne systémique. Ces observations indiquent que ce monomère de peptidoglycane pénètre dans la cavité générale et induit la réponse systémique au niveau du corps gras et/ou des hémocytes. Nos résultats ne permettent cependant pas de déterminer à travers quel épithélium la diffusion du peptidoglycane a lieu. Il pourrait s'agir de l'épithélium génital ou intestinal. Cependant, nous pouvons rejeter l'hypothèse selon laquelle cette infection dépendrait d'une infection orale

puisque la bactérie *Ecc15*, qui n'induit pas de réponse systémique après infection orale, induit une réponse systémique après infection génitale. De plus, le fait que nous n'observons pas de réponse chez la femelle est en faveur d'un passage au travers de l'appareil génital.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de cette translocation, nous avons testé deux mécanismes alternatifs qui ont été proposés comme intervenant dans l'internalisation intracellulaire de fragments de peptidoglycane chez les Vertébrés : le passage transmembranaire par le transporteur Pept1 ou l'endocytose clathrine/dynamine-dépendante. Nos résultats à l'aide d'interférence ARN ciblant les homologues de ces gènes chez la *Drosophile* penchent en faveur d'un rôle de la transcytose dans ce processus. Cependant, ces résultats sont encore préliminaires, et il est possible que l'endocytose soit impliquée plus directement dans la régulation de la réponse épithéliale (voir IV.B.1).

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'infection orale par certaines bactéries induit également une réponse systémique, et des travaux menés dans notre laboratoire suggèrent que la communication entre intestin et corps gras est médiée par une diffusion de peptidoglycane à travers l'intestin (Zaidman-Remy et al., 2006). Nos travaux appuient cette hypothèse mais ne la prouvent pas directement car ils utilisent un mode d'infection différent. Il a été proposé que les hémocytes interviennent dans la communication entre intestin et corps gras (Basset et al., 2000; Charroux and Royet, 2009). Nous avons rejeté cette hypothèse dans le cas des infections génitales car l'expression systémique de la Diptéricine n'était pas affectée dans des mouches déplétées en hémocytes. Enfin, il serait intéressant de tester si l'oxyde nitrique joue un rôle dans la communication entre appareil génital et corps gras, comme cela a été proposé dans le cas de l'intestin (Foley and O'Farrell, 2003).

B. Le dialogue glandes salivaires-corps gras

Les mécanismes impliqués dans l'induction de la réponse systémique après infection orale pourraient être différents chez l'adulte et chez la larve. On notera en particulier que la bactérie *Ecc15* induit une réponse systémique chez la larve et non chez l'adulte. Charroux et Royet ont rapporté que la réponse systémique induite par l'infection orale chez la larve était régionalisée (Charroux and Royet, 2009). Selon ces auteurs, la réponse systémique peut être localisée soit dans l'ensemble du corps de la larve, soit dans ses pôles antérieur et postérieur uniquement (Charroux and Royet, 2009). Il est possible que la réponse systémique dans la région antérieure soit induite dans le corps gras avoisinant les

glandes salivaires et qu'elle se propage ou non par la suite dans l'ensemble du corps gras, en fonction de son intensité. Cette hypothèse est corroborée par le fait que le corps gras est associé de façon très étroite aux glandes salivaires, ce qui n'est pas le cas de l'intestin (Demerec, 1950).

Nous avons observé que la Défensine est induite dans le corps gras avoisinant les glandes salivaires et que cette expression est déficiente chez le mutant *PGRP-LA*. *PGRP-LA* pourrait donc être impliqué dans la communication entre les glandes salivaires et le corps gras. Si cela est vérifié, il serait intéressant de tester si les hémocytes sont impliqués dans ce processus, car *PGRP-LA* est fortement exprimé dans ces cellules (Irving et al., 2005; Werner et al., 2000). Nos données révèlent que *PGRP-LA* n'est pas impliqué dans la communication entre intestin et corps gras ou entre appareil génital et corps gras, ce qui concorde avec le fait que ce gène n'est exprimé ni dans l'intestin moyen ni dans l'appareil génital (Chintapalli et al., 2007).

C. Synthèse sur les dialogues épithélia-corps gras

Divers dialogues entre le corps gras et les épithélia ont été caractérisés. La translocation de peptidoglycane à travers l'épithélium barrière semble être un processus clé dans l'intestin et l'appareil génital, respectivement avec et sans l'intervention des hémocytes (Basset et al., 2000). L'oxyde nitrique aurait un rôle dans la communication entre intestin et corps gras, d'une façon également dépendante des hémocytes (Foley and O'Farrell, 2003). Cependant, l'inactivation du gène NOS par interférence ARN n'affecte pas l'activation de la réponse systémique (Scherfer et Lemaitre, données non publiées). Par ailleurs, nos données suggèrent un rôle de *PGRP-LA* dans la signalisation entre les glandes salivaires et le corps gras.

Il est possible que les épithélia communiquent également entre eux mais cela n'a pas été étudié après infection chez la *Drosophile*. Cependant, il a été rapporté qu'une surexpression artificielle de la forme sécrétée de *PGRP-LE* par les glandes salivaires induisait une réponse Imd-dépendante dans l'intestin (Abdelsadik and Roeder, 2010). Une communication entre divers épithélia peut être directe dans des épithélia situés en continuité les uns des autres, comme les glandes salivaires et l'intestin, mais pourrait également se faire par le biais du corps gras ou des trachées qui relient les organes.

Dans une revue récente sur le futur de l'immunologie mucoale, Gill et al affirment que ces dialogues entre épithélia seront probablement un sujet important dans la décennie à venir (Gill et al., 2010). Après avoir caractérisé la

réponse immunitaire dans les poumons ou dans l'intestin, certaines observations poussent en effet les immunologistes à s'intéresser à une vision plus globale de ces organes au sein de l'organisme. Par exemple, l'utilisation d'antibiotiques chez les nouveaux-nés serait associée à une propension à développer de l'asthme, ce qui suggère un lien entre la composition de la flore dans l'intestin et la réponse allergique dans les poumons. Ces auteurs soulignent le besoin de considérer les composants de l'immunologie mucoale comme un « système immunitaire mucoal commun », un terme proposé il y a plus de 40 ans par John Bienenstock (cité dans Gill et al., 2010).

VI. Les fonctions des PGRP

A. PGRP-LA, entre réponse épithéliale et réponse systémique

Comme nous l'avons mentionné précédemment, deux rôles de PGRP-LA ressortent de nos résultats. D'une part, PGRP-LA serait impliqué dans l'expression des gènes codant les AMP dans les épithélia des trachées et des glandes salivaires. Plus particulièrement, l'expression des AMP est plus faible dans ces deux tissus après infection et, au moins dans les trachées, au niveau basal. D'autre part, PGRP-LA serait impliqué dans la communication entre réponse locale et réponse systémique, dans la région des glandes salivaires larvaires. Ces rôles paraissent relativement différents et peuvent concorder avec plusieurs hypothèses sur la fonction moléculaire précise de PGRP-LA. Par exemple, ce gène pourrait être impliqué directement dans la réponse épithéliale, laquelle induirait la réponse systémique, notamment par libération de peptidoglycane due à la lyse des bactéries. Alternativement, PGRP-LA pourrait être impliqué dans l'internalisation du peptidoglycane, provoquant à la fois une augmentation de la réponse systémique et une translocation facilitée de cette molécule à travers l'épithélium.

La comparaison de la séquence du domaine PGRP de PGRP-LA avec ceux d'autres PGRP dont la structure a déjà été déterminée suggère que l'absence de liaison directe entre PGRP-LA et le peptidoglycane (Roussel, communication personnelle). Des études biochimiques de ce PGRP seraient donc très utiles pour mieux comprendre le rôle de ce PGRP.

Ainsi, nos travaux ont abouti à la caractérisation d'un phénotype chez le mutant *PGRP-LA*, impliquant ce gène dans le contrôle de l'expression locale des AMP, mais la fonction moléculaire de ce PGRP n'est pas encore claire. Plus

généralement, l'étude des PGRP de la *Drosophile* est relativement bien avancée, mais de nombreuses questions restent encore sans réponse dans ce domaine.

B. Etat de lieux sur l'étude des PGRP de *Drosophile*

Cette partie propose un état des lieux des connaissances actuelles, publiées ou non, sur la fonction des PGRP et des questions qui restent dans ce domaine de recherche. Elle est complétée par un tableau plus exhaustif de la littérature scientifique sur les PGRP de *Drosophile* (voir Tableau).

1) Les PGRP récepteurs

PGRP-LC et PGRP-LE sont les principaux récepteurs induisant la voie Imd, à la fois localement et dans les épithélia. Des analyses *in vitro* révèlent que l'isoforme PGRP-LCx serait impliquée dans la reconnaissance du peptidoglycane polymérique, alors que PGRP-LCx et LCa sont toutes deux nécessaires à la reconnaissance du peptidoglycane monomérique (Kaneko et al., 2004). Des analyses en cours utilisant des mutants spécifiques de chaque isoforme visent à vérifier cette hypothèse *in vivo* et à déterminer la fonction de l'isoforme PGRP-LCy, dont la fonction est encore totalement inconnue.

PGRP-LE est également impliqué dans l'induction de la phagocytose lors d'infections intracellulaires, par *Listeria monocytogenes* en particulier.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que la réception de la voie Toll nécessite l'internalisation du récepteur Toll par endocytose clathrine-dépendante (Huang et al., 2010). L'éventualité d'un tel type de transduction de signal dans l'induction de la voie Imd par PGRP-LC est en cours d'analyse au laboratoire.

PGRP-SA et SD sont les récepteurs de la voie Toll, mais leurs rôles respectifs ne sont pas totalement connus (Bischoff et al., 2004; Leone et al., 2008; Michel et al., 2001). En effet, le mutant PGRP-SA présente une sensibilité et un défaut d'induction de la voie Toll après infection par des bactéries à Gram-positif, mais il est capable d'induire une réponse à certaines bactéries à Gram-positif (Bischoff et al., 2004; Michel et al., 2001). Il a été proposé que PGRP-SD soit partiellement redondant avec PGRP-SA dans l'induction de la voie Toll par reconnaissance de PGRP de type Lys (Bischoff, 2004) ou, plus récemment, de type DAP (Leone et al., 2008). Le phénotype de PGRP-SD après infection par des bactéries à peptidoglycane de type DAP n'a cependant pas été reproduit dans notre laboratoire, et la forte induction de ce gène pourrait favoriser l'hypothèse

selon laquelle PGRP-SD serait un effecteur de la réponse (Lemaitre, non publié). Une étude non publiée du laboratoire de P. Lygoxygakis révèle que PGRP-SA se lierait aux parties récemment synthétisées de la paroi bactérienne chez *S. aureus* (mentionné dans Welchman et al., 2009). La présence d'acide téichoïque dans les parties plus anciennes empêcherait cette liaison.

Enfin, les mécanismes de transduction du signal entre PGRP-SA et ModSP ne sont pas totalement élucidés. En particulier, il a été mis en évidence que la protéine ModSP était capable d'autoclivage *in vitro*, mais le lien exact entre la reconnaissance du peptidoglycane et l'induction de ce clivage n'a pas été établi *in vivo* (Buchon et al., 2009c). Il a été proposé que GGBP1 soit un adaptateur entre PGRP-SA et ModSP lors de la transduction du signal.

2) Les PGRP régulateurs

PGRP-LB et les PGRP-SC1A/1B/2 sont vraisemblablement des régulateurs négatifs de la voie Imd, par leur capacité à dégrader le peptidoglycane en fragments non immunogènes (Bischoff et al., 2006; Zaidman-Remy et al., 2006). Des analyses par interférence ARN ont en effet mis en évidence que l'inactivation de ces gènes induit une réponse accrue et prolongée. Une analyse à l'aide de mutations par invalidation (« Knock Out ») de ces gènes est en cours. Des travaux non publiés confirment ce phénotype chez le mutant *PGRP-LB* mais pas chez le mutant pour le locus *PGRP-SC1A/1B/2* (Welchman, en préparation). Cependant, le double mutant *PGRP-SC1A/1B/2*; *PGRP-LB* présente un phénotype plus marqué que le simple mutant *PGRP-LB* (Welchman, en préparation), ce qui suggère que PGRP-SC1A/1B/2 régulerait également de façon négative la réponse immunitaire, mais en redondance partielle avec PGRP-LB. Par ailleurs, il a été mis en évidence par interférence ARN et par mutation que l'inactivation de *PGRP-SC1A/1B/2* induisait une létalité larvaire après infection par Ecc15 (Bischoff et al., 2006; Welchman, en préparation). Enfin, une caractérisation individuelle de chacun des gènes du locus *PGRP-SC1A/1B/2* reste encore à déterminer. *PGRP-SC2* a notamment un patron d'expression très particulier, puisqu'il n'est observé que pendant la métamorphose.

PGRP-LF régule négativement la réponse Imd au niveau de PGRP-LC (Persson et al., 2007; Maillet et al., 2008). Cependant, deux hypothèses subsistent quant à sa fonction moléculaire: il pourrait soit lier le peptidoglycane, diminuant ainsi la concentration en peptidoglycane libre, soit séquestrer PGRP-LC quand la

concentration en peptidoglycane est faible. Des données non publiées révèlent que PGRP-LF ne lierait pas le peptidoglycane *in vitro*, favorisant ainsi cette seconde hypothèse (Roussel, communication personnelle).

3) Les PGRP « mystérieux »

La fonction d'un certain nombre de PGRP reste mal connue. C'est le cas de PGRP-SB1, dont l'activité de dégradation du peptidoglycane de type DAP a été mise en évidence *in vitro*, et qui a été proposé comme étant un effecteur bactéricide de la réponse (Mellroth and Steiner, 2006). Cependant, son effet bactéricide n'a pas été confirmé dans notre laboratoire. Le mutant pour PGRP-SB1 ne présente pas de phénotype immunitaire clair (Welchman, communication personnelle), ce qui n'est pas forcément contraire à une fonction d'effecteur car les effecteurs ont probablement des actions redondantes.

Enfin, PGRP-LD est un gène exprimé au sein d'un ARN bicistronique, avec le gène mitochondrial *pmi* (Flybase). PGRP-LD présente également un signal de localisation mitochondrial (Royet, 2009). Une mutation du locus *pmi-PGRP-LD* est à l'origine du phénotype bang, caractérisé par l'immobilité de mouches après un choc exercé sur le tube qui les renferment, et à une altération du contrôle du nombre et de la taille des mitochondries (Royet, 2009). Cependant, une surexpression de *pmi* chez le mutant suffit à sauver ce phénotype, et aucun phénotype immunitaire du simple mutant *PGRP-LD* n'a été communiqué jusqu'à présent.

nom	1er auteur	année	approche	impliqué dans :	vérifié dans d'autres articles (*: même laboratoire et/ou mêmes auteurs)
PGRP-LA	Werner	2000	Northern blot	exprimé de l'embryon à l'adulte, surtout dans prépupe, non induit après injection de bactéries ou de PGN	légèrement induit après infection : dans cette thèse
			Northern blot	chez la larve, exprimé surtout dans les hémocytes	Oui : Irving, 2005
	Rämet	2002	crible ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans phagocytose de Gram - (E. coli) ou Gram + (S.aureus)	Oui: Zaidman-Rémy, Poidevin, non publié
			ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans expression des AMP après infection E.Coli (Cellules S2)	Oui: mouches entières, dans cette thèse
			ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans expression des AMP après traitement LPS (Cellules S2)	
	Choe	2002	ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans expression des AMP (Dpt, CecA1, Atta) après traitement PG, LPS, E.coli (Cellules S2)	Oui: mouches entières, dans cette thèse
	Irving	2005	puces à ADN	légèrement réprimé dans les hémocytes après infection par E. coli + M. luteus	
	Wagner	2009	puces à ADN	induit dans les trachées après infection naturelle de larves	Oui: dans cette thèse
	Gendrin	2010, thèse	mutant; puces à ADN	immunité basale dans les trachées	
Gendrin	2010, thèse	mutant; observations Def GFP	communication immunitaire entre glandes salivaires et corps gras		
semble impliqué dans l'expression basale des AMP par le biais de la voie Imd; pourrait être impliqué dans la communication entre glandes salivaires et corps gras					
PGRP-LB	Werner	2000	Northern blot	exprimé de l'embryon à l'adulte, surtout dans L2, induit après injection de B. subtilis ou de PGN	Oui: induction par l'infection, De Gregorio, 2001
	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	Oui: induction par Ecc15, Zaidman-Rémy, 2006 et Welchman, non publié; Non: induction par M. luteus, Werner, thèse
	Irving	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne (E. coli, M. luteus) mais pas fongique (B. bassiana)	
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle de la voie Imd	
	Mellroth	2003	analyse de séquences	activité NAMLAA putative	Oui: Zaidman-Rémy, 2006
	Kim	2003	détermination de structure	structure à 2Å près: le PGN est lié dans une crevasse, au fond de laquelle est situé un ion Zinc; peu de conservation dans le site actif avec les autres PGRP, probablement lié à des spécificités variées	
			détermination de structure	peptide spécifique de PGRP (par rapport à lysozyme T7) sur la face opposée au site actif, pourrait être impliqué dans la signalisation après liaison au PGN	
	Zaidman-Rémy	2006	ARNi; biochimie	PGRP-LB est induit après infection; actif sur fragment de DAP-type PGN, surtout TCT; régulation négative de la voie Imd, notamment de la réponse systémique après infection orale; hypothèse: tolérance aux bactéries commensales	Oui: Welchman* (mutant PGRP-LB), non publié
	Ryu	2008	mouches axéniques	expression dépendante de la flore dans l'intestin	
	Buchon	2009	puces à ADN (intestin)	induit dans l'intestin adulte après infection par Ecc15	
	Welchman	non publié	mutant; mouches axéniques	régulation négative de la voie Imd; tolérance à la flore	
Gendrin	2010, thèse	puces à ADN (trachées)	induit dans les trachées larvaires après infection par Ecc15		
impliqué dans une boucle de rétroaction négative, par dégradation du PGN: tolérance à la flore et retour à la normale après infection					
PGRP-LC	Werner	2000	Northern blot	chez la larve, exprimé surtout dans les hémocytes	
	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle des voies Imd et Toll	
	Rämet	2002	crible ARNi (cellules S2)	phagocytose de Gram - (E. coli) mais pas Gram + (S.aureus)	oui mais effet très léger : Kocks*, 2005; Non: Choe, 2002
			ARNi (cellules S2)	expression des AMP (Att) après infection E.Coli (Cellules S2)	oui: Gottar 2002, Choe 2002 par ex
			ARNi (cellules S2)	expression des AMP (Att) après traitement LPS (Cellules S2)	Non : contaminations de PGN dans LPS commercial (Leulier, 2003); ce sont uniquement les contaminations de PGN qui induisent (Kaneko, 2004)
	Gottar	2002	mutants (totem = Δ5:excision EP; N18: insertion EP)	survie Gram - (E.coli) mais pas Gram + (M. luteus)	oui: Gottar 2002, Choe 2002 par ex
			mutant (7454:EP)	expression des AMP (Dpt,Att,Cec) après infection Gram (E.Coli, A. tumefaciens) pas impliqué dans expression AMP (Drs) après infection Gram + (M. luteus) ou champignons (B. bassiana) survie Gram - (A. tumefaciens, Ecc, E. cloacae) mais pas Gram + (M. luteus)	oui: Rämet 2002, Choe 2002 par ex oui: Rämet 2002, Choe 2002 par ex
			mutant (ΔE:excision frt) surexpression (hs-Gal4, yolk-Gal4)	survie Gram - (A. tumefaciens) induction Dpt-lacZ (larves, femelles), pas Drs-GFP epistasie: en amont d'Imd sauvetage de survie du mutant à E. cloacae	oui: Rämet 2002, Choe 2002 oui: Choe 2002 par ex oui oui
	Leulier	2003	mutant (ΔE)	induction voie Imd par DAP-type PGN (E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis, B. thuringiensis)	oui: Kaneko 2004 par ex
	Choe	2002	mutants (ird7(1) et ird7(2): EP; ird7(2) est spécifique à PGRP-LCx)	expression AMP (Dpt, Cec, Def, Att, Mtk, Drs) après Gram - (tous:E.coli, Dpt:E. cloacae) et Gram + (Dpt:M. luteus, B. subtilis) pas impliqué dans phagocytose de bactéries (données non montrées) clivage de Relish	oui: Rämet 2002, Gottar 2002 par ex Non: Rämet 2002, Kocks, 2005 oui

		surexpression PGRP-LCx ou PGRP-LCa (c564-Gal4)	sauvetage induction Dpt-lacZ	oui
		ARNi (cellules S2)	expression d'AMP(Dpt, Ceca1,Att) par stimulation par PG, LPS, E. coli	oui: Râmet 2002, Gottar 2002 par ex
Werner	2003	ARNi (cellules S2)	PGRP-LCx : unique isoforme nécessaire pour l'expression des AMP après traitement par des bactéries Gram + (M. luteus, B. megaterium); PGRP-LCa et LCx impliqués dans la réponse aux bactéries Gram - (E. coli, E. cloacae), dans la réponse au LPS (LPS sans PGN); pas d'effet de ARNi contre PGRP-LCx	oui pour PGRP-LCx; Non pour le LPS (contaminations, Kaneko 2004)
Kaneko	2004	RNAi (cellules S2)	PGRP-LCx reconnaît le PGN polymérique, et le dimère PGRP-LCx/LCa reconnaît la TCT	Mellroth* 2005
Choe	2005	biochimie (co-immunoprécipitation, cellules S2)	liaison physique de PGRP-LCx et LCa avec Imd (abolie par délétion des résidus 1-135 de Imd), liaison homotypique de PGRP-LCx (abolie par délétion des résidus 144-263) et de PGRP-LCx/LCa	
Mellroth	2005	biochimie (cellules S2)	PGRP-LCx lie le PGN monomérique et dimérique, PGRP-LCa n'en lie aucun mais lie PGRP-LCx associé au PGN monomérique	Oui pour PGRP-LCx, mais PGRP-LCa lie la TCT avec affinité faible (Swaminathan, 2006)
		immunolocalisation (cellules S2)	PGRP-LCx est localisé à la membrane plasmique, avec le domaine PGRP du côté extracellulaire	
Chang	2005	biologie structurale	structure du domaine PGRP de LCa à 2,5Å; 2 hélices alpha empêchent la liaison au PGN	
Chang	2006	biologie structurale	co-cristallisation de PGRP-LCx, PGRP-LCa, TCT : importance de la boucle anhydro pour l'association de LCx et LCa, et importance de DAP pour la spécificité	
Gottar	2006	mutants	induction de la voie Imd par des spores de B. bassiana tuées par la chaleur	
Kaneko	2006	mutants (délétions de divers domaines); double mutant LE;LC (expression des peptides, co-immunoprécipitation)	importance du motif RHIM pour la signalisation Imd de LC; interaction physique PGRP-LC/Imd non nécessaire pour la signalisation (délétion des résidus 87-148 empêche interaction physique)	
Schmidt	2008	fusion-GFP; mutants divers	PGRP-LC est réprimé après infection par des Gram - et l'activation protéolytique de PGRP-LC induit la voie Imd et le mélanisation	Non: induit, De Gregorio,2001; oui:PGRP-LCa clivé induit la voie Imd, Maillet, 2008; non: clivage impliqué dans l'induction de la voie Imd, Neyen, non publié
principal récepteur de la réponse Imd après infection orale dans l'intestin, et après piqûre septique dans le corps gras; LCx lie le PGN polymérique et PGRP-LCx/LCa le PGN monomérique				
PGRP-LD	Werner	2000	Northern blot	transcrit court présent dès les heures 0-5 de l'embryon (probablement maternel) long transcrit apparaît plus tard; non induit après infection
			Northern blot	chez la larve, exprimé faiblement dans les hémocytes
	Râmet	2002	crible ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans phagocytose de Gram - (E. coli) ou Gram + (S.aureus)
			ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans expression des AMP après infection E.Coli (Cellules S2)
			ARNi (cellules S2)	pas impliqué dans expression des AMP après traitement LPS (Cellules S2)
	Royet	2009, Aussois	mutant	pas de phénotype immunitaire; ARN bicistronique; associé au gène mitochondrial Pmi
fonction encore non caractérisée				
PGRP-LE	Werner	2000	Northern blot	transcrit présent dès les heures 0-5 de l'embryon (probablement maternel) long transcrit apparaît plus tard; non induit après infection
	Takehana	2002	surexpression (hs-Gal4)	Expression des AMP (Dpt, Drs, Att) en amont d'Imd, Rel; Dpt dans corps gras et Drs dans les trachées et glandes salivaires
			surexpression (hs-Gal4)	Mélanisation locale puis systémique aboutissant à la mort des larves
			biochimie	liaison au PGN de Gram - (N. calcarea, L. plantarum) mais pas de Gram + (S. epidermidis, S. aureus)
	Takehana	2004	mutant (excision EP), doubles mutants; surexpression	partiellement redondant avec PGRP-LC pour survie à E. coli et certains bacilles (B. megaterium, B. subtilis), et dans l'induction de la Drs par la voie Imd (infection Ecc15) de façon non-autonome cellulaire dans les trachées et le corps gras
			surexpression (c564-Gal4)	induction de la mélanisation induite par l'infection par E. coli
			immunolocalisation, Western blot	présent dans les trachées et le corps gras
	Lim	2006	biologie structurale	PGRP-LE lié à la TCT : la TCT induit une multimérisation de PGRP-LE
			analogie de séquences	PGRP-LCx et LCa interagissent probablement par un mécanisme semblable à la multimérisation de PGRP-LE
	Kaneko	2006	mutant (délétions de divers domaines); double mutant LE;LC (expression des peptides, observations, coimmunoprécipitation)	PGRP-LE(domaine PGRP+RHIM): récepteur intracellulaire de PGN monomérique, redondant avec PGRP-LC, et PGRP-LE (juste domaine PGRP): récepteur extracellulaire favorisant l'induction de Imd par PGRP-LC (par dimérisation); importance du motif RHIM pour la signalisation Imd de PGRP-LC et LE

	Libert	2006	surexpression (S106)	induction constitutive des AMPs; réduction de la longévité (non dépendante du régime alimentaire)	oui: Lhocine, 2008
	Yano	2008	mutant, ARNi	survie à L. monocytogenes; induction de l'autophagie par reconnaissance de PGN; colocalise avec vésicules d'autophagie	Oui (survie L. monocytogenes), Gendrin, non publié
	Goto	2010	puces à ADN (cellules S2)	induction de l'expression de la Listericin en réponse à L.monocytogenes (nouvel AMP)	
	récepteur secondaire induisant la réponse Imd; impliqué dans l'induction de l'autophagie après détection de bactéries intracellulaires				
PGRP-LF	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle de la voie Imd	
	Werner	2003	ARNi (cellules S2)	2 domaines PGRP, z et w, dans le même transcrit	oui
				pas d'effet d'ARNi contre PGRP-LF lors de traitements par des bactéries, du PGN ou du LPS	oui: réponse conservée en absence de PGRP-LF: Persson, 2007, Maillet, 2008
	Persson	2007	biochimie (cellules S2)	localisation membranaire, domaines PGRP du côté extracellulaire; domaine z lie PGN (surtout DAP, mais aussi Lys) et domaine w juste PGN de E.coli; régulation négative de la voie Imd	Oui: Maillet, 2008; pas de liaison au PGN: Roussel, non publié
	Maillet	2008	ARNi; mutant (excision EP)	régulation négative de la voie Imd et JNK; protéine membranaire	
	Wagner	2009	puces à ADN (trachées)	induit dans les trachées après infection naturelle de larves	Oui: dans cette thèse
	Buchon	2009	puces à ADN (intestin)	induit dans l'intestin adulte après infection orale	
	impliqué dans la régulation négative de la voie Imd, probablement par liaison avec PGRP-LC				
PGRP-SA	Werner	2000	Western blot	lie le PGN de M. luteus	oui
			Northern blot	détecté à partir de L2; induit après infection par B. subtilis ou injection de PGN	Oui (induction): de Gregorio 2001
			Northern blot	chez la larve, exprimé dans le corps gras et les hémocytes	
	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	
	Irving	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne (E. coli, M. luteus) et fongique (B. bassiana)	
	Michel	2001	mutant (semi:EMS, crible chr. I)	expression AMP (Drs) après infection Gram +(M. luteus, S. faecalis, B. thuringiensis) mais pas Gram - (E. coli, Ecc, E. cloacae) ou Champignons (B. bassiana)	oui: Leulier, 2003
				survie infection Gram + (B. subtilis, S. faecalis), mais pas Gram - (E. coli, Ecc) ni Champignons (B. bassiana)	
			expression constitutive (Toll10b, nec1/nec2)	en amont de Toll et nec	
			transfert d'hémolymph	code une protéine soluble dans l'hémolymph	
			surexpression	sauvetage du mutant pour expression Drs et survie Gram + (S. faecalis)	
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle des voies Imd et Toll	
	Leulier	2003	mutant (semi)	induction voie Toll par Lys-type PGN (M. luteus)	Oui: Pili-Floury* (2004) : également avec Lys- type PGN purifié (M. luteus)
	Gobert	2003	mutant; surexpression	nécessite GNB1 pour l'induction de la voie Toll après infection par bactéries Gram + (M. luteus), mais pas champignons (B. bassiana)	Oui: Pili-Floury (2004) : également avec Lys- type PGN purifié (M. luteus)
			biochimie (Western blot)	interaction physique avec GNB1	Oui: Wang 2006
	Reiser	2004	biologie structurale	structure à 1,56Å près, qui ressemble d'une façon générale à la structure de PGRP-LB; dans la crevasse, certains résidus semblent former une triade catalytique modifiée : suggère une activité hydrolytique	Oui : Chang 2004
	Chang	2004	biologie structurale; biochimie	structure à 2,2Å près; activité carboxypeptidase sur tétrapeptides appartenant au DAP-type PGN, qui assure la spécificité de la voie Toll au Lys-type PGN	Oui: Reiser 2004
	Irving	2005	puces à ADN	induit dans les hémocytes après infection larvaire par E.coli+M.luteus	
	Filipe	2005	mutants; biochimie	reconnaissance des mucopeptides dimériques préalablement dégradés par GNB1	
	Wang	2006	biochimie	interaction physique avec GNB1 en présence de PGN,affinité augmente en présence de PGN; clive PGN, activité faible mais le dimère GNB1/PGRP-SA est plus actif	
	Park	2007	biochimie	lie plus fortement le PG prédigéré par le lysozyme	
	Buchon	2009	puces à ADN (intestin)	induit dans l'intestin adulte après infection orale	
	Gendrin	2010, thèse	puces à ADN (trachées)	induit dans les trachées après infection naturelle de larves	
	soluble dans l'hémolymph, récepteur principal induisant la voie Toll systémique, en liant GNB1				
PGRP-SB1	Werner	2000	Northern blot	ARN détecté chez prépuces et adultes; induit fortement après infection par B. subtilis ou injection de PGN	Oui : De Gregorio 2001
			Northern blot	chez les larves, induit dans corps gras	
	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	Oui: Irving, 2001
	Irving	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne (E. coli, M. luteus) mais pas fongique (B. bassiana)	Oui (infection par M. luteus, E. cloacae), thèse de T. Werner
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle de la voie Imd	Oui: Mellroth*, 2006
	Mellroth	2003	analyse de séquences	activité NAMLAA putative	
	Jiggins	2003	analyse de séquences	haut niveau de polymorphismes synonymes, en particulier dans la région centrale	
	Irving	2005	puces à ADN	induit dans les hémocytes après infection larvaire par E.coli+M.luteus (non détecté en absence d'infection)	

	Mellroth	2006	biochimie	activité NAMLAA sur DAP-type PGN (B. megaterium, et plus faible sur L. plantarum; E. coli) mais pas sur Lys-type (S. aureus, M. luteus); antibactérien (B. megaterium; dépendant de Zn, donc de NAMLAA)	Activité antibactérienne non reproduite in vitro, Welchman, non publié
	Lemaitre	non publié	mutant	pas de susceptibilité à l'infection	
	Buchon	2009	puces à ADN (intestin)	induit dans l'intestin adulte après infection orale	
	Gendrin	2010, thèse	puces à ADN (trachées)	induit dans les trachées après infection naturelle de larves	
dégradation du PGN, mais la fonction n'est pas clairement caractérisée; le mutant n'a pas de phénotype immunitaire caractérisé					
PGRP-SB2	Werner	2000	Northern blot	ARN détecté chez prépuces uniquement, expression très forte; non induit après infection	
			Northern blot	exprimé dans la carcasse, mais seulement faiblement dans le corps gras de prépuces	
	Mellroth	2003	analyse de séquences	activité NAMLAA putative	
	Jiggins	2003	analyse de séquences	haut niveau de polymorphismes synonymes, en particulier dans la région centrale	
exprimé spécifiquement chez les jeunes pupes, pas de fonction caractérisée					
PGRP-SC1A/B	Werner	2000	Northern blot	ARN détecté chez larves et adultes uniquement; non induit après infection	légèrement induit après infection, Werner*, thèse
			Northern blot	exprimé dans l'intestin larvaire	
	Jiggins	2003	analyse de séquences	évolution concertée entre PGRP-SC1A et PGRP-SC1B	
	Bischoff	2006	ARNi	avec PGRP-SC2: régulation négative de la réponse Imd (infection par E. cloacae, E. coli, B. subtilis) chez les larves; réponse Toll normale; survie larvaire à l'infection par E. coli, Ecc15	Oui: survie, Non: réponse Imd, Welchman, non publié
			ARNi	avec PGRP-SC2: encoche dans l'aile	Non: mutant, Welchman, non publié
	Buchon	2009	puces à ADN (intestin)	induit dans l'intestin adulte après infection orale	
Welchman	non publié	mutant	survie larvaire à l'infection orale; réponse normale chez le mutant; redondant avec PGRP-LB pour la régulation négative de la voie Imd		
PGRP-SC1A	Mellroth	2003	analyse de séquences	activité NAMLAA putative	
	Irving	2005	puces à ADN	induit dans les hémocytes après infection larvaire par E. coli+M. luteus (non détecté en absence d'infection)	
	Garver	2006	mutant	induction de la voie Toll, phagocytose de bactéries à Gram + (S. aureus) mais pas Gram - (E. coli)	Non: Bischoff, 2006; pas détecté dans le crible de Râmet, 2002; pas d'effet sur la voie Toll ni sur la survie à S. aureus, Welchman, non publié
surexpression			sauvetage; activité catalytique requise pour phagocytose mais pas pour induction voie Toll; sauvetage par simple injection de PGN libre dans l'hémolymphe		
PGRP-SC1B	Werner	2000	Western blot	lie le PGN de M. luteus	
	Mellroth	2003	biochimie (mesures d'absorbance, HPLC, spectrométrie de masse)	dégradation de PGN (activité NAMLAA) de S. aureus, B. megaterium, M. luteus	
			mutants (mutagenèse ciblée) in vitro (Cellules mbn2)	l'activité enzymatique est Zinc-dépendante	
PGRP-SC2	Werner	2000	Northern blot	ARN détecté chez larves et adultes; faiblement induit après infection	Oui: De Gregorio, 2001; Irving, 2001
			Northern blot	exprimé dans l'intestin larvaire	
	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	
	Irving	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne (E. coli, M. luteus) et fongique (B. bassiana)	Oui (infection par M. luteus, E. cloacae), thèse de T. Werner
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle des voies Imd et Toll	
	Mellroth	2003	analyse de séquences	activité NAMLAA putative	
	Irving	2005	puces à ADN	induit dans les hémocytes après infection larvaire par E. coli+M. luteus (non détecté en absence d'infection)	
	Bischoff	2006	ARNi	avec PGRP-SC1: régulation négative de la réponse Imd (infection par E. cloacae, E. coli, B. subtilis) chez les larves; réponse Toll normale; survie larvaire à l'infection par E. coli, Ecc15	Pas de phénotype du mutant, mais effet du double mutant PGRP-LB, SC1/2: Welchman, non publié
ARNi			avec PGRP-SC1: encoche dans l'aile	Non: mutant, Welchman, non publié	
dégradation du PGN, probablement impliqués dans la régulation de la voie Imd, partiellement ou totalement en redondance avec PGRP-LB					
PGRP-SD	Werner	2000	Northern blot	ARN détecté faiblement chez larves et prépuces; fortement induit après injection de B. subtilis ou de PGN	
			Northern blot	induit dans le corps gras après infection	Oui: De Gregorio, 2001; Irving, 2001
	De Gregorio	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne, non induit après infection fongique	
	Irving	2001	puces à ADN	induit après infection bactérienne (E. coli, M. luteus) et fongique (B. bassiana)	
	De Gregorio	2002	puces à ADN	induit sous contrôle de la voie Imd	
	Bischoff	2004	mutant (excision EP)	partiellement redondant avec PGRP-SA et GNBP1 dans l'induction de la voie Toll en réponse à certaines bactéries à Gram + (S. aureus, E. faecalis, S. pyogenes, S. saprophyticus), ou de PGN de S. aureus; non impliqué dans réponse au champignons (C. neoformans) ou aux bactéries à Gram - (E. coli)	Oui: Wang, 2001; mais pas de liaison au Lys-type PGN de S. aureus, Leone*, 2008
	Leone	2008	biologie structurale	structure à 1,5Å près; liaison au DAP-type PGN	

		mutant	induction de la voie Toll par le DAP-type PGN	
Wang	2008	mutant; biochimie	favorise liaison de GNBP1 au Lys-type PGN; formation d'un complexe ternaire PGRP-D/GNBP-1/PGRP-SA en présence de PGN	

C. Les fonctions des PGRP chez les Métazoaires

Les PGRP sont conservés au sein des Métazoaires. Des membres de cette famille ont notamment été caractérisés chez des Insectes, des Mollusques, des Echinodermes, des Vertébrés, alors que le génome du Nématode *C. elegans* ne contient pas de PGRP. Plutôt que de réaliser une description exhaustive de tous les PGRP connus, cette partie a pour objet de traiter des diverses fonctions des PGRP au sein du vivant, en choisissant des exemples dans divers phyla.

1) Les PGRP récepteurs

Comme chez la Drosophile, certains PGRP ont pour fonction d'induire une réponse immunitaire après reconnaissance de peptidoglycane. De telles fonctions ont notamment été mises en évidence chez plusieurs Insectes. C'est notamment le cas du premier PGRP caractérisé, extrait du ver à soie *Bombyx mori*, qui est impliqué dans l'induction de la cascade de prophénoxydase dans l'hémolymphe (Yoshida et al., 1996). De même, il a été mis en évidence que PGRP-SA du Coléoptère *Tenebrio molitor*, l'homologue de PGRP-SA de Drosophile, induit la cascade de prophénoxydase et la voie Toll par multimérisation le long d'une chaîne de peptidoglycane (Park et al., 2007). Par ailleurs, il a rapporté que le nombre de bactéries présentes dans l'intestin de l'Anophèle augmentait fortement après le repas sanguin et que PGRP-SA était requis pour l'expression des AMP en réponse à cette situation (Meister et al., 2009).

2) Les PGRP régulateurs

Des PGRP ont également été caractérisés comme étant impliqués dans la régulation positive ou négative de la réponse immunitaire. En particulier, des PGRP catalytiques interviennent dans la mise en place et le maintien de symbioses. C'est le cas de la Seiche *E. scolopes*, dont un PGRP dégrade la cytotoxine trachéenne produite par son symbionte *V. fisheri* (Troll et al., 2009) et d'Insectes tels que *Sitophilus zeamais* et de la mouche Tsé Tsé, dont la tolérance aux bactéries symbiotiques est médiée par l'action catalytique de wPGRP et PGRP-LB, respectivement (Anselme et al., 2006; Wang et al., 2009). Curieusement, PGRP-LB semble également requis chez la mouche Tsé Tsé dans la résistance aux infections par le Trypanosome, mais les mécanismes de cette action anti-parasitaire sont inconnus (Wang et al., 2009).

Récemment, il a été rapporté que PGLYRP-2 pouvait agir comme cytokine pro-inflammatoire chez la Souris, alors que PGLYRP-1 avait au contraire une action anti-inflammatoire (Saha et al., 2009). Contrairement aux PGRP catalytiques de *Drosophila*, PGLYRP-2 dégrade le peptidoglycane en fragments encore reconnaissables par le récepteur Nod2 et son activité amidase ne serait pas impliquée dans sa fonction régulatrice (Saha et al., 2009).

3) Les PGRP effecteurs

Certains PGRP ont une activité microbicide. C'est le cas des PGLYRP-1, 3 et 4 humains, non-catalytiques (Lu et al., 2006; Wang et al., 2007), et de PGLYRP-2, 5 et 6 du poisson-zèbre, catalytiques (Li et al., 2007). Ces PGRP ont une activité à large spectre contre des bactéries à Gram-positif et à Gram négatif et une inactivation de *PGLYRP-5* rend l'embryon de poisson-zèbre susceptible aux infections bactériennes (Li et al., 2007). Par ailleurs, il a été proposé que PGLYRP-1 humain, lié à HSP70, serait actif contre les cellules tumorales par induction de l'apoptose.

Au vu des rôles très divers que jouent les PGRP dans la réponse immunitaire des Métazoaires, le domaine PGRP ressort comme un exemple intéressant de domaine protéique à fonctions multiples. D'un point de vue évolutif, on peut postuler qu'une protéine à fonction catalytique semblable à celle du Lysozyme du phage T7 a été à l'origine de récepteurs impliqués dans la reconnaissance de peptidoglycane, induisant alors une réponse immunitaire. L'apparition de PGRP régulateurs aurait ensuite apporté la possibilité de réguler plus finement le système.

Conclusion

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la réponse épithéliale chez la *Drosophila* et à ses liens avec la réponse systémique. Nous avons mis en évidence que l'infection génitale induit une réponse locale et systémique chez le mâle et que la communication entre épithélium barrière et corps gras mettait en jeu une diffusion de peptidoglycane vers la cavité générale. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que PGRP-LA est impliqué dans l'expression des gènes codant les AMP dans certains épithélia ainsi que dans le dialogue entre glandes salivaires et corps gras après infection orale.

L'analyse d'une réponse épithéliale nécessite de considérer les relations étroites entre les diverses fonctions physiologiques des tissus. En effet, les épithélia barrières sont à l'interface entre la cavité interne de l'organisme et le milieu extérieur, ce qui leur confère des fonctions contradictoires de favoriser les échanges, de gaz ou de nutriments par exemple, tout en limitant le risque d'infection. Le contrôle de la réponse immunitaire épithéliale dépend donc également de l'état physiologique de ces tissus. Comme nous l'avons mentionné dans ce travail, la réponse immunitaire n'est en effet pas uniquement induite par l'infection, mais elle peut-être déclenchée à un niveau plus faible par l'accouplement et par le jeûne notamment (Becker et al., 2010; Peng et al., 2005; Samakovlis et al., 1991b). La fonction de cette réponse immunitaire en absence d'infection est probablement de préserver l'organisme d'une infection dans certaines situations où ses épithélia sont fragilisés.

Bibliographie

Abdelsadik, A., and Roeder, T. (2010). Chronic activation of the epithelial immune system of the fruit fly's salivary glands has a negative effect on organismal growth and induces a peculiar set of target genes. *BMC genomics* *11*, 265.

Aggarwal, K., Rus, F., Vriesema-Magnuson, C., Erturk-Hasdemir, D., Paquette, N., and Silverman, N. (2008). Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS pathogens* *4*, e1000120.

Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.O., and Heddi, A. (2006). Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Applied and environmental microbiology* *72*, 6766-6772.

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

Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A.C., Carrera, P., Inhester, T., Schultze, J.L., and Hoch, M. (2010). FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* *463*, 369-373.

Belles, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual review of entomology* *55*, 111-128.

Belvin, M.P., and Anderson, K.V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 393-416.

Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., and Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS pathogens* 6, e1000833.

Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I.G., Michel, T., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2004). Function of the *drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nature immunology* 5, 1175-1180.

Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I.G., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2006). Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by Peptidoglycan-Recognition Proteins SC1 and SC2. *PLoS pathogens* 2, e14.

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.

Blandin, S.A., Wang-Sattler, R., Lamacchia, M., Gagneur, J., Lycett, G., Ning, Y., Levashina, E.A., and Steinmetz, L.M. (2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science (New York, NY)* 326, 147-150.

Boman, H. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 61-92.

Boman, H.G., Nilsson, I., and Rasmuson, B. (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* 237, 232-235.

Bou-Aoun (2008). Characterization of Tep genes during the innate immune response in *Drosophila*. American fly meeting (Abstract book), 724A.

Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507-510.

Braun, A., Hoffmann, J.A., and Meister, M. (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14337-14342.

Buchon, N., Broderick, N.A., Chakrabarti, S., and Lemaitre, B. (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & development* 23, 2333-2344.

Buchon, N., Broderick, N.A., Poidevin, M., Pradervand, S., and Lemaitre, B. (2009b). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell host & microbe* 5, 200-211.

Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H.M., Guillou, A., Sottas, V., Lee, B.L., and Lemaitre, B. (2009c). A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 12442-12447.

Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J.L., Lambert, J., Reichhart, J.M., Hoffmann, D., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (1991). Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *The Journal of biological chemistry* *266*, 24520-24525.

Carton, Y., Bouletreau, M., van Alphen, J.J.M., and van Lenteren, J.C. (1986). The *Drosophila* parasitic wasps. In *The genetic and Biology of Drosophila*, A. press, ed. (London), pp. 347-394.

Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., *et al.* (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology* *4*, 702-707.

Charroux, B., Rival, T., Narbonne-Reveau, K., and Royet, J. (2009). Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *11*, 631-636.

Charroux, B., and Royet, J. (2009). Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 9797-9802.

Chintapalli, V.R., Wang, J., and Dow, J.A. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature genetics* *39*, 715-720.

Choe, K.M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D., and Anderson, K.V. (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science (New York, NY)* *296*, 359-362.

Cloud-Hansen, K.A., Peterson, S.B., Stabb, E.V., Goldman, W.E., McFall-Ngai, M.J., and Handelsman, J. (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nature reviews* *4*, 710-716.

Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Letellier, L. (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *The Journal of biological chemistry* *268*, 19239-19245.

Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine* *16*, 90-97.

Cox, C., and Gilmore, M. (2007). Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect Immun* *75*, 1565-.

Cronin, S.J., Nehme, N.T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J.A., Schramek, D., Leibbrandt, A., Simoes Rde, M., Gruber, S., Puc, U., *et al.* (2009). Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science (New York, NY)* *325*, 340-343.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., and Lemaitre, B. (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12590-12595.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., and Lemaitre, B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *Embo J* *21*, 2568-2579.

Defaye, A., Evans, I., Crozatier, M., Wood, W., Lemaitre, B., and Leulier, F. (2009). Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *Journal of innate immunity* *1*, 322-334.

Delaney, J.R., Stoven, S., Uvell, H., Anderson, K.V., Engstrom, Y., and Mlodzik, M. (2006). Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *Embo J* *25*, 3068-3077.

Demerec, M., ed. (1950). *Biology of Drosophila* (New York, John Wiley & Sons, Inc).

Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., and Relman, D.A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* *449*, 811-818.

Dushay, M., Asling, B., and Hultmark, D. (1996). Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 10343-10347.

Dziarski, R., and Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome biology* *7*, 232.

El Chamy, L., Leclerc, V., Caldelari, I., and Reichhart, J.M. (2008). Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. *Nature immunology* *9*, 1165-1170.

Ferrandon, D., Imler, J.L., and Hoffmann, J.A. (2004). Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond. *Seminars in immunology* *16*, 43-53.

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

Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol*.

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

Garver, L.S., Wu, J., and Wu, L.P. (2006). The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 660-665.

Gendrin, M., Welchman, D.P., Poidevin, M., Herve, M., and Lemaitre, B. (2009). Long-range activation of systemic immunity through peptidoglycan diffusion in *Drosophila*. *PLoS pathogens* *5*, e1000694.

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

Gill, N., Wlodarska, M., and Finlay, B.B. (2010). The future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ. *Nature immunology* *11*, 558-560.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., *et al.* (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science (New York, NY)* *300*, 1584-1587.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry* *278*, 8869-8872.

Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2003). Dual activation of the

Drosophila toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science (New York, NY)* *302*, 2126-2130.

Goto, A., Yano, T., Terashima, J., Iwashita, S., Oshima, Y., and Kurata, S. (2010). Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial Listericin by peptidoglycan recognition protein LE and the JAK-STAT pathway. *The Journal of biological chemistry* *285*, 15731-15738.

Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.M., Wang, C., Butt, T.M., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* *127*, 1425-1437.

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

Guan, X., Middlebrooks, B.W., Alexander, S., and Wasserman, S.A. (2006). Mutation of TweedleD, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 16794-16799.

Ha, E.M., Lee, K.A., Park, S.H., Kim, S.H., Nam, H.J., Lee, H.Y., Kang, D., and Lee, W.J. (2009). Regulation of DUOX by the Galphaq-phospholipase Cbeta-Ca²⁺ pathway in *Drosophila* gut immunity. *Developmental cell* *16*, 386-397.

Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., and Lee, W.J. (2005a). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science (New York, NY)* *310*, 847-850.

Ha, E.M., Oh, C.T., Ryu, J.H., Bae, Y.S., Kang, S.W., Jang, I.H., Brey, P.T., and Lee, W.J. (2005b). An Antioxidant System Required for Host Protection against Gut Infection in *Drosophila*. *Developmental cell* *8*, 125-132.

Haselkorn, T.S. (2010). The Spiroplasma heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila*. *Fly* *4*, 80-87.

Hayward, A.P., Tsao, J., and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in cell & developmental biology* *20*, 1041-1047.

Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., and Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell* *4*, 827-837.

Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2008). Wolbachia and virus protection in insects. *Science (New York, NY)* *322*, 702.

Hematy, K., Cherk, C., and Somerville, S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current opinion in plant biology* 12, 406-413.

Huang, H.R., Chen, Z.J., Kunes, S., Chang, G.D., and Maniatis, T. (2010). Endocytic pathway is required for *Drosophila* Toll innate immune signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8322-8327.

Hultmark, D. (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 15, 12-19.

Huszar, T., and Imler, J.L. (2008). *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Advances in virus research* 72, 227-265.

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

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., *et al.* (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry* 4, 4.

Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7, 335-350.

Ismair, M.G., Vavricka, S.R., Kullak-Ublick, G.A., Fried, M., Mengin-Lecreulx, D., and Girardin, S.E. (2006). hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 1313-1319.

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

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology. The immune system in health and disease. Garland Publishing 5th Edition.*

Jiang, H., and Edgar, B.A. (2009). EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development (Cambridge, England)* 136, 483-493.

Junell, A., Uvell, H., Davis, M.M., Edlundh-Rose, E., Antonsson, A., Pick, L., and Engstrom, Y. (2010). The POU transcription factor Drifter/Ventral veinless regulates expression of *Drosophila* immune defense genes. *Molecular and cellular biology* 30, 3672-3684.

Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N. (2004).

Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* *20*, 637-649.

Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W.E., Oh, B.H., *et al.* (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature immunology* *7*, 715-723.

Kim, M., Lee, J.H., Lee, S.Y., Kim, E., and Chung, J. (2006). Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 16358-16363.

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

Kleino, A., Myllymaki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L.M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S., and Ramet, M. (2008). Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. *J Immunol* *180*, 5413-5422.

Kono, H., Chen, C.J., Ontiveros, F., and Rock, K.L. (2010). Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of clinical investigation* *120*, 1939-1949.

Koropatnick, T.A., Kimbell, J.R., and McFall-Ngai, M.J. (2007). Responses of host hemocytes during the initiation of the squid-*Vibrio* symbiosis. *The Biological bulletin* *212*, 29-39.

Lauwers, A., Twyffels, L., Soin, R., Wauquier, C., Kruys, V., and Gueydan, C. (2009). Post-transcriptional Regulation of Genes Encoding Antimicrobial Peptides in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* *284*, 8973-8983.

Lavazec, C., and Bourgouin, C. (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting *Plasmodium* development. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *10*, 845-849.

Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology* *25*, 697-743.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J., and Hoffmann, J. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* *92*, 9365-9469.

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

Lemaitre, B., Reichhart, J., and Hoffmann, J. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 14614-14619.

Leone, P., Bischoff, V., Kellenberger, C., Hetru, C., Royet, J., and Roussel, A. (2008). Crystal structure of *Drosophila* PGRP-SD suggests binding to DAP-type but not lysine-type peptidoglycan. *Molecular immunology* *45*, 2521-2530.

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

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M., and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* *1*, 353-358.

Levashina, E.A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science (New York, NY)* *285*, 1917-1919.

Lhocine, N., Ribeiro, P.S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Lemaitre, B., Gstaiger, M., Meier, P., and Leulier, F. (2008). PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell host & microbe* *4*, 147-158.

Li, X., Wang, S., Qi, J., Echtenkamp, S.F., Chatterjee, R., Wang, M., Boons, G.J., Dziarski, R., and Gupta, D. (2007). Zebrafish Peptidoglycan Recognition Proteins Are Bactericidal Amidases Essential for Defense against Bacterial Infections. *Immunity* *27*, 518-529.

Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F., and Lemaitre, B. (2006). Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS pathogens* *2*, e56.

Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (2002a). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science (New York, NY)* *297*, 114-116.

Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., Jiang, H., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (2002b). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *Embo J* *21*, 6330-6337.

Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2006). Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *The Journal of biological chemistry* *281*, 5895-5907.

Maillet, F., Bischoff, V., Vignal, C., Hoffmann, J., and Royet, J. (2008). The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell host & microbe* *3*, 293-303.

Marina-Garcia, N., Franchi, L., Kim, Y.G., Hu, Y., Smith, D.E., Boons, G.J., and Nunez, G. (2009). Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J Immunol* *182*, 4321-4327.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* *12*, 991-1045.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* (New York, NY), 301-305.

McFall-Ngai, M., Nyholm, S.V., and Castillo, M.G. (2010). The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes*-*Vibrio fischeri* symbiosis. *Seminars in immunology* *22*, 48-53.

Meister, M. (2004). Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* *16*, 10-15.

Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Religio, A., Morlais, I., Kafatos, F.C., and Christophides, G.K. (2009). *Anopheles gambiae* PGRP-LC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS pathogens* *5*, e1000542.

Mellroth, P., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *The Journal of biological chemistry* *278*, 7059-7064.

Mellroth, P., and Steiner, H. (2006). PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem Biophys Res Commun* *350*, 994-999.

Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2005). Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J Endotoxin Res* *11*, 105-111.

Mercot, H., and Charlat, S. (2004). *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica* *120*, 51-59.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nature immunology* *5*, 503-507.

Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* *414*, 756-759.

Miest, T.S., and Bloch-Qazi, M.C. (2008). Sick of mating: Sexual transmission of a pathogenic bacterium in *Drosophila melanogaster*. *Fly* *2*.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., *et al.* (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* *139*, 1268-1278.

Nehme, N.T., Liegeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J.A., Ewbank, J.J., and Ferrandon, D. (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens* *3*, e173.

Ni, J.Q., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L.P., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L., and Perrimon, N. (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nature methods* *5*, 49-51.

O'Neill, S.L. (2010). *Wolbachia* on the bay - 6th international *Wolbachia* conference.

Park, J.W., Kim, C.H., Kim, J.H., Je, B.R., Roh, K.B., Kim, S.J., Lee, H.H., Ryu, J.H., Lim, J.H., Oh, B.H., *et al.* (2007). Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 6602-6607.

Peng, J., Zipperlen, P., and Kubli, E. (2005). *Drosophila* sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr Biol* *15*, 1690-1694.

Persson, C., Oldenvi, S., and Steiner, H. (2007). Peptidoglycan recognition protein LF: a negative regulator of *Drosophila* immunity. *Insect biochemistry and molecular biology* *37*, 1309-1316.

Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Molecular immunology* *41*, 1099-1108.

Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R.A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* *416*, 644-648.

Ratnieks, F.L., and Carreck, N.L. Ecology. Clarity on honey bee collapse? *Science* (New York, NY) *327*, 152-153.

Romeo, Y., and Lemaitre, B. (2008). *Drosophila* immunity : methods for monitoring the activity of toll and imd signaling pathways. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ *415*, 379-394.

Royet, J. (2009). Are bacteria implicated in *Drosophila* antibacterial immunity ? (Oral communication). Conférence Jacques Monod - Insect Immunity in action.

Royet, J., and Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature reviews* *5*, 264-277.

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.

Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M., and Lee, W.J. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* (New York, NY *319*, 777-782.

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

Saha, S., Qi, J., Wang, S., Wang, M., Li, X., Kim, Y.G., Nunez, G., Gupta, D., and Dziarski, R. (2009). PGLYRP-2 and Nod2 are both required for peptidoglycan-induced arthritis and local inflammation. *Cell host & microbe* *5*, 137-150.

Saleh, M.C., Tassetto, M., van Rij, R.P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C., and Andino, R. (2009). Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature* *458*, 346-350.

Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D., Engström, A., and Hultmark, D. (1991a). The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* *10*, 163-169.

Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D.A., Engstrom, A., and Hultmark, D. (1991b). The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* *10*, 163-169.

Scherfer, C., Qazi, M.R., Takahashi, K., Ueda, R., Dushay, M.S., Theopold, U., and Lemaitre, B. (2006). The Toll immune-regulated *Drosophila* protein Fondue is involved in hemolymph clotting and puparium formation. *Dev Biol* *295*, 156-163.

Scherfer, C., Tang, H., Kambris, Z., Lhocine, N., Hashimoto, C., and Lemaitre, B. (2008). *Drosophila* Serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation. *Dev Biol.*

Schneider, D. (2000). Using *Drosophila* as a model insect. *Nature Rev Genetics* 1, 218-225.

Shanbhag, S., and Tripathi, S. (2009). Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *The Journal of experimental biology* 212, 1731-1744.

Sidahmed, A.M., and Wilkie, B. (2010). Endogenous antiviral mechanisms of RNA interference: a comparative biology perspective. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 623, 3-19.

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

Stecher, B., Chaffron, S., Kappeli, R., Hapfelmeier, S., Friedrich, S., Weber, T.C., Kirundi, J., Suar, M., McCoy, K.D., von Mering, C., *et al.* (2010). Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS pathogens* 6, e1000711.

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

Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan- recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13705-13710.

Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S. (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *Embo J* 23, 4690-4700.

Tan, S.Y., and Dee, M.K. (2009). Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore medical journal* 50, 456-457.

Tang, H. (2009). Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly* 3, 105-111.

Tang, H., Kambris, Z., Lemaitre, B., and Hashimoto, C. (2008). A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*. *Developmental cell* *15*, 617-626.

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. *Nature immunology* *3*, 91-97.

Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS biology* *6*, e2.

Thevenon, D., Engel, E., Avet-Rochex, A., Gottar, M., Bergeret, E., Tricoire, H., Benaud, C., Baudier, J., Taillebourg, E., and Fauvarque, M.O. (2009). The *Drosophila* ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling. *Cell host & microbe* *6*, 309-320.

Troll, J.V., Bent, E.H., Pacquette, N., Wier, A.M., Goldman, W.E., Silverman, N., and McFall-Ngai, M.J. (2009). Taming the symbiont for coexistence: a host PGRP neutralizes a bacterial symbiont toxin. *Environmental microbiology*.

Tzou, P., De Gregorio, E., and Lemaitre, B. (2002a). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Op Microbiol* *5*, 102-110.

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

Tzou, P., Reichhart, J.M., and Lemaitre, B. (2002b). Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immuno-deficient *Drosophila* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 2152-2157.

Uvell, H., and Engstrom, Y. (2007). A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet* *23*, 342-349.

Vidal, S., Khush, R.S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes & development* *15*, 1900-1912.

Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., and Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection

by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 11414-11419.

Wagner, C., Isermann, K., and Roeder, T. (2009). Infection induces a survival program and local remodeling in the airway epithelium of the fly. *FASEB J* *23*, 2045-2054.

Wang, J., Wu, Y., Yang, G., and Aksoy, S. (2009). Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 12133-12138.

Wang, M., Liu, L.H., Wang, S., Li, X., Lu, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2007). Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides. *J Immunol* *178*, 3116-3125.

Wang, Z., Wilhelmsson, C., Hyrsil, P., Loof, T.G., Dobes, P., Klupp, M., Loseva, O., Morgelin, M., Ikle, J., Cripps, R.M., *et al.* (2010). Pathogen entrapment by transglutaminase--a conserved early innate immune mechanism. *PLoS pathogens* *6*, e1000763.

Wei, Y., Xiao, Q., Zhang, T., Mou, Z., You, J., and Ma, W.J. (2009). Differential regulation of mRNA stability controls the transient expression of genes encoding *Drosophila* antimicrobial peptide with distinct immune response characteristics. *Nucleic acids research* *37*, 6550-6561.

Welchman, D.P., Aksoy, S., Jiggins, F., and Lemaitre, B. (2009). Insect immunity: from pattern recognition to symbiont-mediated host defense. *Cell host & microbe* *6*, 107-114.

Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 13772-13777.

Xi, Z., Ramirez, J.L., and Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens* *4*, e1000098.

Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, W.E., Fukase, K., Silverman, N., *et al.* (2008). Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. *Nature immunology* *9*, 908-916.

Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of biological chemistry* *271*, 13854-13860.

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