



HAL
open science

Etude de l'interaction entre inflammation et infection chez la drosophile

Ramy Ragheb

► **To cite this version:**

Ramy Ragheb. Etude de l'interaction entre inflammation et infection chez la drosophile. Sciences du Vivant [q-bio]. Aix-Marseille Université, 2016. Français. NNT : 2016AIXM4104 . tel-04529572

HAL Id: tel-04529572

<https://amu.hal.science/tel-04529572v1>

Submitted on 2 Apr 2024

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.

Université d'Aix-Marseille
Faculté des sciences de Luminy
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
TAGC – Technologie Avancée pour le Génome et la Clinique – Inserm U1090

Etude de l'interaction entre inflammation et infection chez la drosophile

Par Ramy Ragheb

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université d'Aix-Marseille
Spécialité Bio-informatique et Génomique

Thèse présentée et soutenue publiquement à Marseille le 15 Décembre 2016

Composition du Jury :

Pr. Julien Royet	Président du jury
Dr. Marie-Odile Fauvarque	Rapporteur
Dr. Armel Gallet	Rapporteur
Pr. Jean-Marc Cavaillon	Examineur
Dr. Catherine Nguyen	Directrice de thèse
Dr. Laurence Röder	Directrice de thèse

Avant-propos

Pendant ma thèse, je me suis intéressé à la mise en place d'un modèle d'étude des relations inflammation/infection *in vivo* chez un invertébré, *Drosophila melanogaster*.

J'ai développé cette idée avec Arnaud Defaye car au TAGC des analyses sont réalisées autour de la compréhension des mécanismes impliqués dans les infections post-traumatiques, aujourd'hui encore la première cause de mortalité dans le monde. Suite à une blessure grave, une réponse inflammatoire excessive peut conduire à une altération, un déséquilibre de la réponse immunitaire qui prédispose les patients aux infections opportunistes. Ainsi chez un patient présentant un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), une infection entraîne l'apparition du sepsis qui peut évoluer vers de lourds dommages organiques menant souvent à la mort. Ce syndrome entraîne à long terme de graves problèmes de santé chroniques, et cause près d'un mort toutes les 3-4 secondes dans le monde. L'ampleur de ce syndrome du sepsis est telle qu'il fait partie des enjeux majeurs de santé planétaire représentant toujours la première cause de mortalité par infection.

Ainsi pour mieux comprendre les interactions entre inflammation et infection, j'ai proposé de mettre en place un modèle d'étude chez la drosophile. Cet organisme est confronté à une grande variété d'agents infectieux ou à des blessures et est capable de se défendre grâce à une réponse immunitaire innée. Cette ligne de défense qui est conservée chez tous les métazoaires, est phylogénétiquement plus ancienne que la réponse immunitaire adaptative, apparue il y a environ 400 millions d'années et qui n'existe en revanche que chez les vertébrés... Pour étudier l'interaction entre inflammation et infection chez la mouche, j'ai induit d'une part une blessure par piqure stérile ou/et une infection par piqure septique sur la partie dorsale du thorax de l'adulte. J'ai dans un premier temps observé la survie des drosophiles pendant cinquante heures suivant leur manipulation et j'ai mis en évidence un effet délétère significatif sur la survie des mouches de l'inflammation associée l'infection comparé à l'infection uniquement. Je me suis ensuite intéressé aux mécanismes moléculaires pouvant expliquer la différence de survie des Drosophiles blessées

et infectées par rapport aux Drosophiles infectées ; plus précisément, j'ai analysé grâce à une étude transcriptomique, la cinétique des événements moléculaires précoces mis en jeu suite à un trauma précédent une infection. Les résultats de ce travail sont présentés dans ce mémoire de thèse sous le format d'une publication. Dans la partie bibliographique constituant l'introduction de ce travail de recherche, j'expose brièvement la complexité du processus d'infection post-traumatique chez les mammifères en focalisant sur la première réponse apportée par le système immunitaire inné ; cet exposé a pour but d'amener le lecteur à mieux appréhender la difficulté d'analyser les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette réponse chez les vertébrés. Je m'attache ensuite à décrire les réponses inflammatoire et immune de la drosophile. J'ai enfin réalisé un compte rendu sur trois études récentes portant sur les interactions inflammation/infection réalisées chez la drosophile et leurs conséquences sur divers types de tissus (muscle, neurones).

J'ai aussi réalisé au cours de ma thèse des études d'associations génétiques pangénomiques (GWAS) effectuées à partir de données collectées chez des patients reçus à l'hôpital en raison d'infection et analysé l'association de polymorphismes nucléotidiques avec la survenue d'un choc septique. J'ai de plus réalisé les analyses statistiques d'une étude transcriptomique par hybridation sur puce à ADN de sang de patients atteints du syndrome Sézary, une forme agressive de lymphome T cutané caractérisé par une érythrodermie (rougeur congestive de la peau, disparaissant à la vitropression), une lymphadénopathie (hypertrophie du ganglion lymphatique) et la présence de lymphocytes atypiques circulants.

Cette partie de mon travail de thèse est réunie dans une seconde partie pour laquelle l'introduction consiste en une présentation théorique des analyses GWAS.

Table des matières

Avant-propos.....	3
Partie I : Etude de l'interaction entre inflammation et infection chez la drosophile.....	9
Introduction.....	11
Le trauma active le système immunitaire inné chez les mammifères	13
Trauma et réponse pro-inflammatoire	16
Trauma et réponse anti-inflammatoire.....	18
Les modèles animaux invertébrés dans les études des relations infection/inflammation et des réponses à la blessure.	19
La drosophile, un modèle pour les études d'interactions hôtes/pathogènes	21
Les modèles d'étude de l'infection chez la drosophile	25
Les modes d'infection.....	26
Le système immunitaire de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
L'immunité cellulaire.....	27
L'immunité humorale.....	32
Les peptides antimicrobiens (AMPs).....	32
Une induction sous le contrôle des voies Toll et « immune deficiency » IMD.....	33
La voie Toll : réponses aux infections fongiques ou de bactéries à Gram-positif	34
La voie IMD : réponses aux infections par des bactéries à Gram-négatif	36
Spécificité de réponses ?	36
L'initiation des voies Toll et IMD	37
Reconnaissance du peptidoglycane bactérien	38
Structure du peptidoglycane.....	38
Les PGRP (PeptidoGlycan Recognition Protein).	39
La régulation négative de la réponse	42
Régulation de la voie Toll	42
Au niveau de l'initiation de la réponse.....	42
Au niveau de la transduction du signal	42
Régulation de la voie IMD	44
Au niveau de l'initiation de la réponse.....	44
Au niveau de la transduction du signal	45
Voies inflammatoires.....	46
Inflammation stérile chez la drosophile.....	46

Les cellules nécrotiques.....	47
Les « undead cells » ou cellules morts-vivantes.....	49
Les blessures.....	51
Effets de la réponse inflammatoire.....	52
Les cytokines.....	53
La signalisation TNF	54
Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	56
Les voies JNK et JAK/STAT	57
Voie JNK.....	58
La régulation de la voie JNK.....	60
Voie JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription).....	61
Description de la voie JAK/STAT	61
La régulation de la voie JAK/STAT	62
Voie JAK/STAT et immunité humorale	64
Voie JAK/STAT et immunité cellulaire	64
Etudier le syndrome du sepsis chez la drosophile ?.....	65
Résultats.....	79
Interaction entre trauma et infection chez la drosophile: rôle central de la voie de signalisation JNK et de CrebA.....	79
Discussions et perspectives.....	135
Partie II	157
I) A la recherche de variants potentiellement impliqués dans la survenue d'un choc septique	157
Introduction : Les études d'associations pangénomiques : Théorie.....	157
Les marqueurs génétiques : polymorphismes nucléotidiques (Single nucleotide polymorphism, SNP)	159
Des SNPs particuliers : Les Tag SNP.....	160
Contrôle qualité des données génétiques collectées.....	161
Taux de succès ou Call Rate.....	161
Fréquence de l'allèle mineur	162
L'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE).....	162
Stratification au sein de la population	163
Résultats : Association de polymorphismes au développement d'un choc septique : données de la cohorte PROWESS (The Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis).....	165
Présentation des données de la cohorte PROWESS.....	168

Phénotypes et covariables	169
Génotypage et sélection des patients et des SNPs	169
II) Etude transcriptomique de patients atteints du syndrome de Sézary	173
Références.....	210

Partie I : Etude de l'interaction entre inflammation et infection chez la drosophile

Introduction

Les infections post-traumatiques restent aujourd'hui encore l'une des premières causes de mortalité humaine dans le monde [World Health Organization ; <http://www.who.int/healthinfo>]. Suite à un trauma, la mortalité peut survenir à trois moments: i) dans les premières heures suite à la blessure et la mortalité est alors la conséquence de la blessure elle-même, ii) dans les 24h suite au trauma et cette phase de mortalité peut être due à des chocs hémorragiques, iii) enfin et de manière plus intrigante, la mortalité peut survenir plus d'une semaine après le trauma. Les causes de cette phase de mortalité sont principalement des complications infectieuses menant à des syndromes tels que le sepsis et la dysfonction d'organes multiples (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS). La présence de dysfonctions d'organes associés – défaillance multiviscérale – définit le sepsis sévère, et la survenue d'une défaillance circulatoire définit le choc septique. Dans 69% des cas de MODS, un sepsis est considéré comme le mécanisme étiologique les autres cas se développant après trauma et choc hémorragique.

Le sepsis est un syndrome affectant environ 10% des patients atteints de trauma. La gravité de ce syndrome est associée à la sévérité de la blessure [Wafaisade *et al.* 2011] comme le montre une étude basée sur des données cliniques de 29 829 patients enregistrés au « Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery » entre 1993 et 2008. Ces patients ont été admis à l'hôpital suite à un trauma sévère caractérisé par un score, Injury Severity Score ou ISS; ce score permet de déterminer la gravité d'un patient polytraumatisé et prend en compte les 3 lésions les plus graves affectant la tête et le cou, la face, le thorax, l'abdomen et pelvis, le bassin et les membres ainsi que la peau et les tissus sous cutané [Baker *et al.* 1974]. Sur l'ensemble des patients, 10,2% (3042/29 829) ont développé un sepsis et, parmi eux, le taux de mortalité a été de 19,5%. L'idée a consisté à tester les associations entre des facteurs de risques (tels que l'âge, les traitements médicaux préalables) et l'ISS, avec la susceptibilité à développer un sepsis et une analyse en régression logistique multivariée a permis de déterminer que l'ISS était associé au développement d'un sepsis. En d'autres termes, plus l'ISS d'un patient est fort, plus le risque de développer un sepsis est grand.

Une question importante est de comprendre comment le trauma affecte le système immunitaire et prédispose l'hôte à des infections opportunistes. Le système immunitaire protège l'hôte des infections de différentes natures mais joue aussi un rôle crucial dans la réparation tissulaire lors d'un trauma. La réparation des dommages présentés par un tissu lésé et la préservation de l'intégrité de l'organisme nécessite une réponse rapide et organisée représentée par la réponse immunitaire innée générant une réponse pro-inflammatoire locale qui se met en place au plus tard dans les deux heures. Dans le cas d'un trauma important, cette réponse inflammatoire se propage ensuite au niveau systémique, on parle alors de SIRS pour syndrome de réponse inflammatoire systémique. Cette réponse inflammatoire a pour fonction de permettre la cicatrisation et l'élimination des tissus endommagés mais aussi de protéger l'hôte d'une infection secondaire en intensifiant les défenses antimicrobiennes. Ces processus sont contrôlés principalement par l'activation de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-6 sécrétée par les macrophages. D'autre part, une réponse anti-inflammatoire initiée par le système immunitaire inné, puis régulée principalement par le système immunitaire adaptatif au travers des lymphocytes T, est mise en place. [Moore *et al.* 1993 ; Bone 1996]. La spécificité (grâce à un large répertoire de molécules de reconnaissance engendrées par des réarrangements somatiques : immunoglobulines, récepteurs des cellules T) et la mémoire (sélection clonale de lymphocytes spécifiques) sont deux caractéristiques essentielles de l'immunité adaptative. Cette réponse, apparue il y a environ 400 millions d'années, n'existe que chez les vertébrés. L'immunité innée, plus ancienne d'un point de vue phylogénétique, existe quant à elle vraisemblablement chez tous les métazoaires. Chez les mammifères, elle constitue la première ligne de défense en réponse aux infections. Elle permet la discrimination entre le soi et le non-soi infectieux grâce à des récepteurs reconnaissant des molécules aux motifs structuraux invariants retrouvés spécifiquement sur l'enveloppe des micro-organismes (récepteur des lipopolysaccharides (LPS), récepteur au mannose). L'activation de ces récepteurs conduit immédiatement à l'induction de mécanismes de défense semblables à ceux déclenchés par l'immunité adaptative (cascade du complément, phagocytose...). Les changements dynamiques du système immunitaire induits par un trauma mènent idéalement au retour à l'homéostasie du tissu lésé. Toutefois lorsque le trauma est sévère, l'homéostasie du système immunitaire n'est pas récupérée et induit un déséquilibre qui prédispose l'hôte aux infections opportunistes et aux complications.

Le trauma active le système immunitaire inné chez les mammifères

Les tissus endommagés ou dysfonctionnels produisent un ensemble hétérogène de signaux endogènes, signaux de danger regroupés sous le terme alarmines ou DAMP. La libération de ces molécules peut se faire passivement par la perméabilité de la membrane plasmique dans le cas d'une mort cellulaire non programmée (nécrose), mais pas dans le cas d'apoptose. Ces molécules peuvent être libérées aussi par un mécanisme actif de sécrétion non canonique, indépendant de la voie Réticulum Endoplasmique – Golgi, impliquant l'activation du complexe multimérique de l'inflammasome qui conduit à l'activation de la caspase 1 (Figure 1) (Keller et al. 2008).

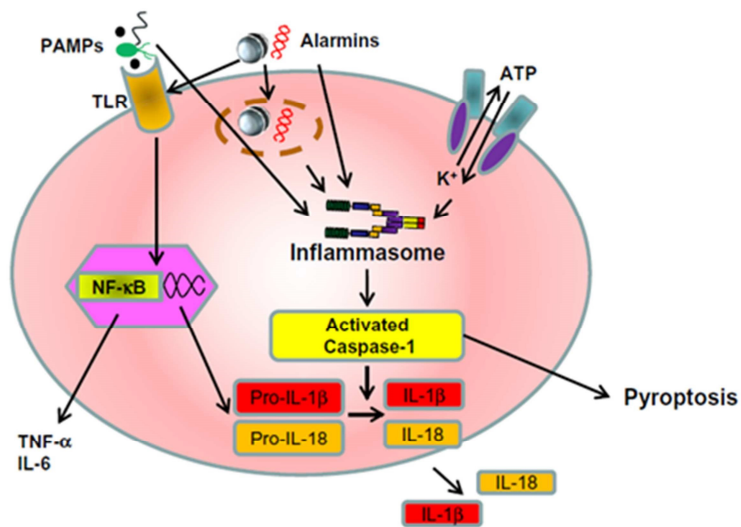


Figure 1 : L'activation du système immunitaire chez l'Homme suite à un trauma. Les signaux de dangers exogènes et endogènes interagissent avec les récepteurs transmembranaires TLR. L'engagement des TLRs par les PAMP engendre une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription tels que les facteurs NFκB et à l'activation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α (tumor necrosis factor α) et l'IL-6. Ces signaux activent aussi le complexe de l'inflammasome qui participe à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et l'IL-18 maturées après l'activation de la caspase-1. L'activation de l'inflammasome mène à une forme pro-inflammatoire de mort cellulaire programmée, la pyroptose, affectant les macrophages infectés par certains micro-organismes ou les lymphocytes CD4 infectés par le VIH. Adapté d'Osuka *et al.* 2014.

Une agression tissulaire peut aussi induire une interaction épithélium-mésenchyme absente normalement sans trauma et conduire à une dé-compartmentation d'éléments cellulaires interprétés comme un signal de danger. C'est le cas par exemple d'une rupture de la barrière épithéliale au niveau de l'intestin qui induit la reconnaissance par les macrophages, *via* leur Toll-like receptor (TLR), des bactéries commensales (Rakoff - Naoum *et al.* 2004).

Chez les vertébrés, différents DAMPs ont été identifiés (Tableau 1) : l'ADN nucléaire ou mitochondrial, la protéine HMGB1 (« High Mobility Group Box 1 »), les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les molécules du cytosquelette, les nucléotides (comme l'ATP) et les nucléosides (comme l'adénosine), l'acide urique, les phosphatidylsérine, les protéines de choc thermique (« Heat Shock Protein » ou HSP), le hyaluronane, l'héparane, le syndécane et probablement d'autres molécules encore non-identifiées [Kono *et al.* 2014]. Ces DAMP permettent le recrutement de cellules immunitaires exprimant des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor), tel que les TLR, présents à la surface de cellules de l'immunité innée comme par exemple les macrophages et les cellules dendritiques (TLR-1, 2, 4 et 6) mais également à la surface des organites intracellulaires (endosomes, lysosomes), et les récepteurs cytoplasmiques Nod-like receptor (NLR). Ces PRR sont également capables de reconnaître, en plus de ces molécules endogènes, des molécules de danger exogènes d'origine microbienne appelées pathogen-associated molecular pattern (PAMP). Les alarmines et les PAMP détectés par les cellules du système immunitaire inné initient la cascade inflammatoire [Matzinger *et al.* 2002 ; Harris *et al.* 2006 ; Oppenheim *et al.* 2005]. La figure 1 illustre une vision globale de l'initiation de la réponse du système immunitaire inné en réponse à un trauma.

Tableau 1 : Nature et sources de DAMPs chez les vertébrés. Adapté de Schaefer 2014.

Compartiment cellulaire / organelle	DAMP	Mécanisme d'induction	Nature chimique	Récepteur
Cytosol	Acide urique	UV	Dérivé de nucléotides puriques	NLRP3
	Protéine S100	LPS	Protéine fixant le calcium	TLR2, TLR4, RAGE
	HSP	Nécrose/apoptose	Protéine chaperonne	TLR2, TLR4
Membrane Plasmique	Syndecane	Heparanase	Protéoglycane	TLR4
	Glypicane	Heparanase	Protéoglycane	TLR4
Mitochondrie	ADN mitochondrial	Trauma, blessure	Acide nucléique	TLR9
	Formyl peptide	Trauma, blessure	Produit issu de la dégradation de protéine mitochondriale	FPR1
	ATP	Blessure	Nucleoside triphosphate	P2X ₇
	ROS mitochondriaux	Fuite d'électrons	Ion, molécule hautement réactive	NLRP3
	Mitochondrie	TNF- α	Organelle	-
	Tfam	Choc hémorragique	Facteur de transcription	-
Noyau	HMGB1	Cellule endommagée	Protéine ayant deux domaines de liaison à l'ADN	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE
	Histones	Sepsis	Protéine permettant l'enroulement de l'ADN double brin	TLR2, TLR4, NLRP3
	ADN	Nécrose/apoptose	Acide nucléique	TLR9, AIM2
Reticulum Endoplasmique (RE)	Calréticuline	Apoptose	Protéine du RE	CD91
Autophagosome	HMGB1	Autophagie	Protéine	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE
	ATP	sevrage	Nucleoside triphosphate	P2X ₇
	IL-1 β	sevrage	Cytokine	IL-1R
Matrice extracellulaire	Biglycane	Synthèse <i>de novo</i>	Protéoglycane	TLR2, TLR4, NLRP3
	Décorine	Synthèse <i>de novo</i>	Protéoglycane	TLR2, TLR4
	Versicane	Sécrétion	Protéoglycane	TLR2, TLR6, CD14
	Hyaluronane	Clivage enzymatique (hyaluronidase)	Glycosaminoglycane	TLR2, TLR4, NLRP3
	Héparane sulfate	Clivage enzymatique (héparanase)	Glycosaminoglycane	TLR4
	Fibronectine EDA	Clivage enzymatique	Glycoprotéine	TLR4
	Fibrinogène	Extravasation	Glycoprotéine	TLR4
Tenascin C	Synthèse <i>de novo</i>	Glycoprotéine	TLR4	

Suite à un trauma, les alarmines activent rapidement le système immunitaire afin de déclencher la cicatrisation des blessures et de protéger l'hôte de l'invasion possible de pathogènes. Cependant, cette activation peut causer une inflammation excessive entraînant un phénotype dit de « double-hit » (Figure 2) [Moore *et al.* 1993 ; Osuka *et al.* 2014].

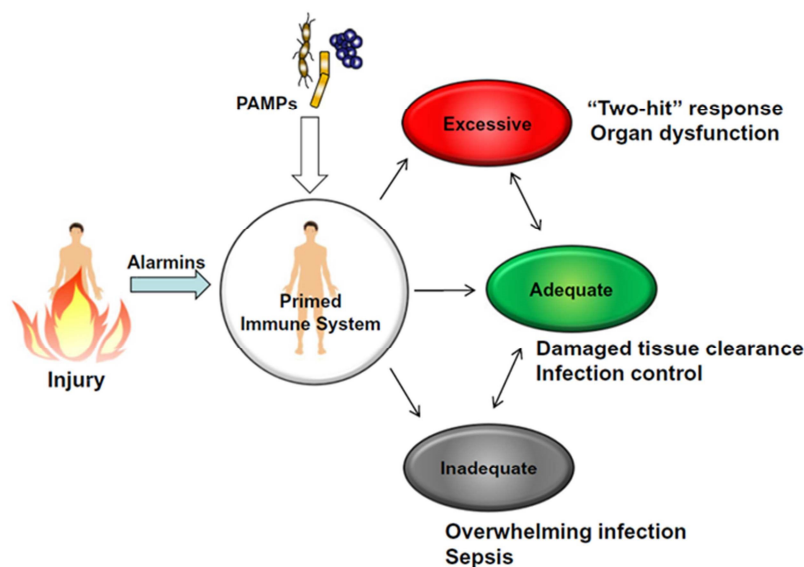


Figure 2: La blessure active le système immunitaire. Suite à un trauma, le système immunitaire s'active afin de protéger l'organisme des dommages tissulaires et des invasions microbiennes. Cependant, une activation non contrôlée peut aboutir à une cascade inflammatoire excessive pouvant mener à des dommages d'organes multiples. Cette cascade inflammatoire excessive est appelée la réponse de « double-hit » (« Two-hit » response). Adapté d'Osuka *et al.* 2014.

Trauma et réponse pro-inflammatoire

Plusieurs études ont montré qu'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) se met en place suite à un trauma [Ogura *et al.* 1999 ; Hoover *et al.* 2006]. La blessure active, dans les deux heures qui suivent, la voie de l'inflammasome dans les nœuds lymphatiques drainant le site de blessure et cette activation se propage de manière systémique. L'inflammasome est un complexe protéique cytoplasmique clef de l'immunité

innée [Martinon *et al.* 2002]. Ce complexe active des caspases qui sont impliquées dans la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1B, l'IL-18 et l'IL-33. L'inflammasome coopère avec les TLR pour activer la réponse inflammatoire et répondre à une infection microbienne ou à un stress métabolique. Paterson *et al.* ont montré chez la souris ayant subi un trauma, que les cellules immunitaires et en particulier les macrophages présentent une plus grande réactivité des récepteurs TLR un jour après la blessure et celle-ci peut persister au-delà de sept jours par rapport à des souris non blessées. En effet, après avoir blessé les souris par brûlure et mis en culture pendant 48h leurs cellules pancréatiques (prélevées à 3h, 24h et 7 jours après la blessure) en présence de peptidoglycane ou de lipopolysaccharide (stimuli connus des récepteurs TLR), une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1B, IL-6 et TNF- α (Tumor Necrosis factor α) par les cellules des souris blessées par rapport aux souris contrôles a été mesurée par la méthode ELISA [Paterson *et al.* 2003]. De plus, afin d'étudier ce phénomène *in vivo*, une injection par voie intrapéritonéale des lipopolysaccharides issus de la bactérie *E. coli* a été réalisée sur les souris blessées, 7 jours après la blessure (contrôle sans injection). 30 minutes et 2 heures après cette injection, les cellules du foie, des poumons et du pancréas des souris blessées voient leur niveau de production des cytokines IL1-B, IL-6 et TNF- α augmentée (déterminée par la méthode ELISA), et cette augmentation est également mesurable dans le plasma donc au niveau systémique [Paterson *et al.* 2003]. Ainsi, la blessure a pour conséquence une réactivité accrue des récepteurs TLR à un second défi du système immunitaire se manifestant par une plus grande production de cytokines par rapport à un individu non blessé. Il est donc possible d'imaginer que cette plus grande réactivité puisse augmenter le niveau des mécanismes de défenses antimicrobiens. C'est ce qu'ont observé Maung *et al.* dans un modèle d'étude de la réponse à l'infection (injection de *E. coli* par voie intrapéritonéale) suite à une brûlure chez la souris. L'hypothèse émise au début de ce travail était que des souris blessées par brûlure présenteraient une susceptibilité à une infection par *E. coli*. Cependant, les résultats montrent que les perturbations du système immunitaire induites par la blessure procurent une résistance de la souris blessée envers une infection par *E. coli*. Pour des souris blessées par brûlure et infectées 7 jours après, la dose létale médiane (LD50), c'est à dire la concentration de bactéries à injecter pour causer la mort de 50 % des individus d'une cohorte, est 50 à 100 fois plus élevée que celle nécessaire pour des souris contrôles. En faisant varier le temps entre la blessure et l'infection, il a été montré

que cette résistance à l'infection est observable jusqu'à 14 jours après la brûlure des souris [Maung *et al.* 2008]. L'activation du système immunitaire inné induite par un événement inflammatoire stérile peut donc semble-t-il, augmenter le niveau de défense contre une infection microbienne.

L'activation du système immunitaire inné peut donc être bénéfique à l'hôte. Mais elle peut aussi lui être préjudiciable. La réponse dite de « double-hit » est une des complications graves à la suite d'un trauma, comme l'ont décrit pour la première fois Moore *et al.* en 1993 : un trauma peut activer l'hôte de telle manière qu'un événement inflammatoire subséquent puisse entraîner une réponse inflammatoire systémique non contrôlée [Moore *et al.* 1993]. L'activation des TLR des macrophages et des neutrophiles suite à une blessure peut être impliquée dans ce phénomène. Ces cellules de l'immunité innée deviennent hyper-réactives à la présence des bactéries et de leurs toxines. En conséquence, de grandes quantités de cytokines sont produites et l'hôte peut développer une deuxième réponse inflammatoire systémique et des MODS [Patterson *et al.* 2003 ; Fan *et al.* 2007 ; Fan *et al.* 2000].

Trauma et réponse anti-inflammatoire

Pour éviter les complications systémiques d'un SIRS non contrôlé, l'organisme développe précocement une réponse anti-inflammatoire systémique compensatrice (CARS). Le CARS entraîne une immunodépression post-traumatique, de durée et d'amplitude variable [Bone 1996 ; Bone 1996b ; Sauaia *et al.* 1996]. Cette immunodépression est physiologique et est présente chez tous les patients. L'immunodépression devient pathologique si elle perdure, entraînant alors des infections post-traumatiques (pneumopathies essentiellement) qui sont la première cause de complications en réanimation. Les différents événements et complications qui suivent la survenue d'un trauma sont résumés dans la figure 3.

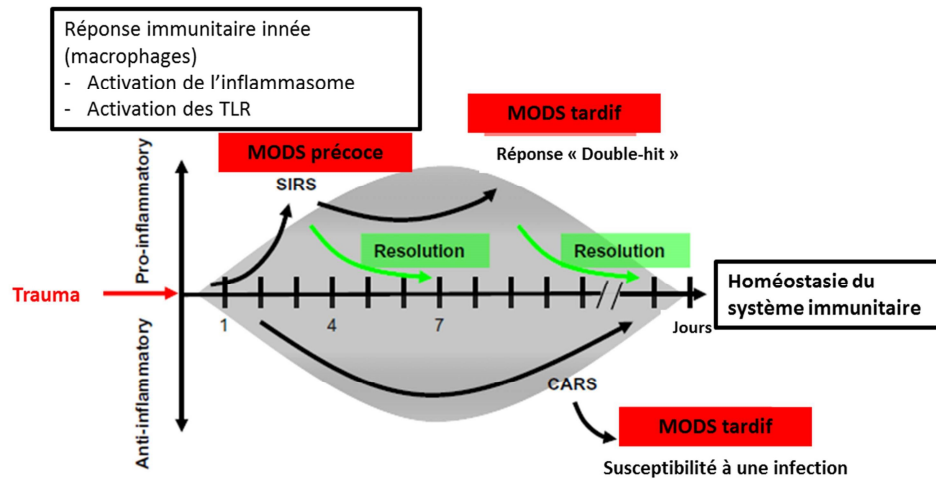


Figure 3 : Perturbation de l'homéostasie du système immunitaire suite à un trauma. Suite à un trauma, l'inflammasome et les récepteurs Toll-like (TLR) sont activés majoritairement dans les macrophages ; l'homéostasie du système immunitaire est perturbée et conduit au développement du syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) et à une réponse anti-inflammatoire systémique compensatrice (CARS). Si la réponse pro-inflammatoire est excessive et non contrôlée, l'hôte développe une réponse dite de « Double-hit » qui conduit au syndrome de dysfonction multiple d'organes (MODS). Cependant, si la réponse pro-inflammatoire, naturellement présente pour éviter les complications systémiques d'un SIRS non contrôlé, est excessive, l'hôte présentera une susceptibilité au développement d'une infection. Adapté d'Osuka *et al.* 2014.

Les modèles animaux invertébrés dans les études des relations infection/inflammation et des réponses à la blessure.

Les événements mis en jeu suite à un trauma sont complexes et, dans les cas du syndrome du sepsis par exemple, impliquent les mécanismes de l'inflammation et ceux des réponses à l'infection. Comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à ces événements est essentiel pour développer de nouvelles thérapies afin d'éviter les complications observées suite à un trauma. Dans ce cadre, l'utilisation de modèles animaux alternatifs aux modèles mammifères est assurément une des clés quant à la compréhension des mécanismes fondamentaux mis en jeu lors des étapes précoces de ces événements et mettant en jeu la réponse immunitaire innée.

L'avantage principal de l'utilisation de modèles animaux pour étudier les interactions hôte/pathogène (dans le cas d'une infection) ou hôte/hôte (dans le cas d'une blessure aseptique) est que l'hôte et son environnement peuvent être tous deux précisément contrôlés. Des mammifères comme les rats, les souris et les lapins sont utilisés en raison de leurs similarités sur le plan anatomique et immunitaire avec l'homme. Cependant l'identification de gènes impliqués dans les mécanismes de réponse à l'infection et à la blessure par le biais de cribles à large échelle reste difficile [Pradel and Ewbank 2004]. En effet l'utilisation de larges cohortes pour ces animaux est rendue difficile pour des raisons de logistique, de budget et d'éthique.

De manière intéressante au cours des vingt dernières années, des études ont montré qu'une grande variété de pathogènes peuvent infecter et causer la mort chez des organismes invertébrés tels que *Drosophila melanogaster* [Lemaitre *et al.* 1996 ; Lemaitre *et al.* 1997 ; Apidianakis *et al.* 2004], le nématode *Caenorhabditis elegans* [Mylonakis *et al.* 2002], la fausse teigne *Galleria mellonella* [Mylonakis *et al.* 2005] et l'amibe *Dictyostelium discoideum* [Steenbergen *et al.* 2003]. Par ailleurs des études de phylogénie ont révélés le caractère conservé au cours de l'évolution de certains aspects importants de l'immunité innée [Medzhitov 2001 ; Hoffmann *et al.* 1999]. Des études de génomique comparative ont ainsi montré qu'il existe une grande proportion de protéines humaines (et particulièrement celles impliquées dans les processus de reconnaissance du pathogène, de la transduction du signal et des réponses de l'immunité innée) ayant des homologues chez des invertébrés tels que la drosophile (60%) et le nématode *C. elegans* (55%). Ainsi, et en raison de l'absence de système immunitaire adaptatif, ces modèles sont des alternatives aux mammifères dans le décryptage moléculaire de la réponse immunitaire innée et ils sont de plus en plus utilisés pour l'étude des interactions hôte/pathogène. En effet, et même en l'absence d'immunité adaptative, les modèles animaux invertébrés sont capables de mettre en place une réponse immunitaire innée efficace contre une grande variété de pathogènes vivants dans le même milieu naturel. Leur système de défense se base sur des réponses épithéliales, la phagocytose et la production de peptides antimicrobiens (Figure 4).

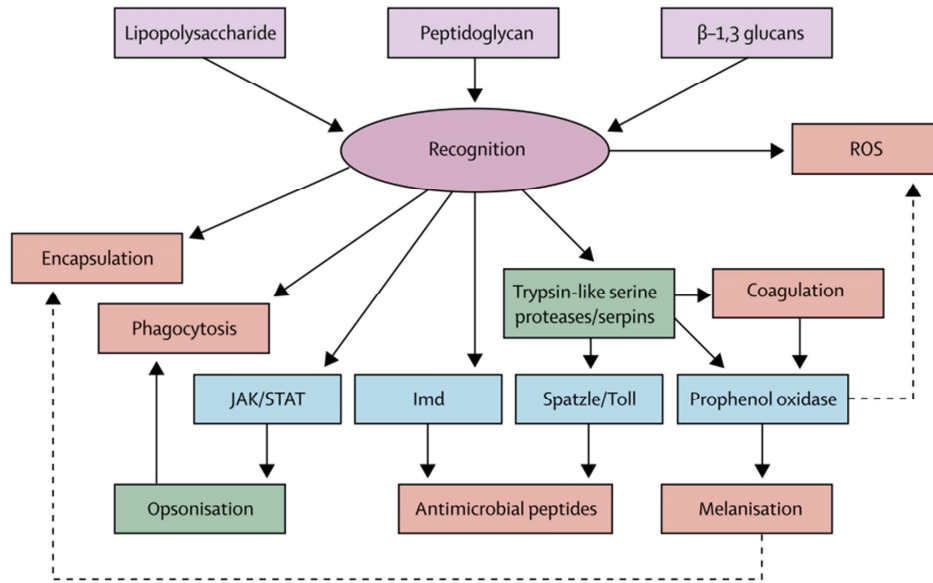


Figure 4 : Schéma global de la réponse immunitaire innée des insectes. La reconnaissance de pathogènes (liposaccharides, peptidoglycanes, β 1-3 glucanes) par les récepteurs PRR conduit à l'activation de réponse immunitaire cellulaire (encapsulation et phagocytose ou opsonisation, processus qui facilite la phagocytose du pathogène) et humorale. En plus du rôle majeur des voies de signalisation Toll et IMD qui dirigent la réponse immunitaire contre les bactéries Gram positives ou les champignons et les bactéries gram négatives respectivement, en induisant la production de peptides antimicrobiens, , l'induction rapide de cascades protéolytiques induisant les processus de coagulation et de mélanisation, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation d'autres voies de signalisation, comme la voie JAK/STAT, sont essentiels pour la défense contre une grande variété de pathogènes que les insectes retrouvent dans leurs environnements naturels. Adapté de Chamilos *et al.* 2007.

La drosophile, un modèle pour les études d'interactions hôtes/pathogènes

Du début du XXe siècle à nos jours, le nombre d'études réalisées dans le champ de l'immunité des insectes a augmenté de décennie en décennie (Figure 5). L'utilisation de modèles invertébrés a permis de réaliser de grandes avancées quant à la compréhension des interactions hôtes/pathogènes concernant de nombreux pathogènes de l'Homme. Cette utilisation a également permis de révéler le caractère conservé de plusieurs de ces interactions chez les organismes supérieurs. Un des modèles invertébrés, la drosophile (*Drosophila melanogaster*), est aujourd'hui considéré comme un modèle permettant l'étude des interactions de l'hôte avec des pathogènes de nature bactérienne [Brandt *et al.* 2004 ;

Cheng *et al.* 2003 ; de Lima Pimenta *et al.* 2003 ; Dionne *et al.* 2003 ; Fauvarque *et al.* 2002], fongique [Alarco *et al.* 2004 ; Lionakis *et al.* 2010], virale, et, avant le séquençage du génome du moustique et le développement subséquent d'outils génétiques, le Plasmodium, parasite responsable de la malaria [Schneider *et al.* 2000 ; Brandt *et al.* 2008 ; Yan *et al.* 2009].

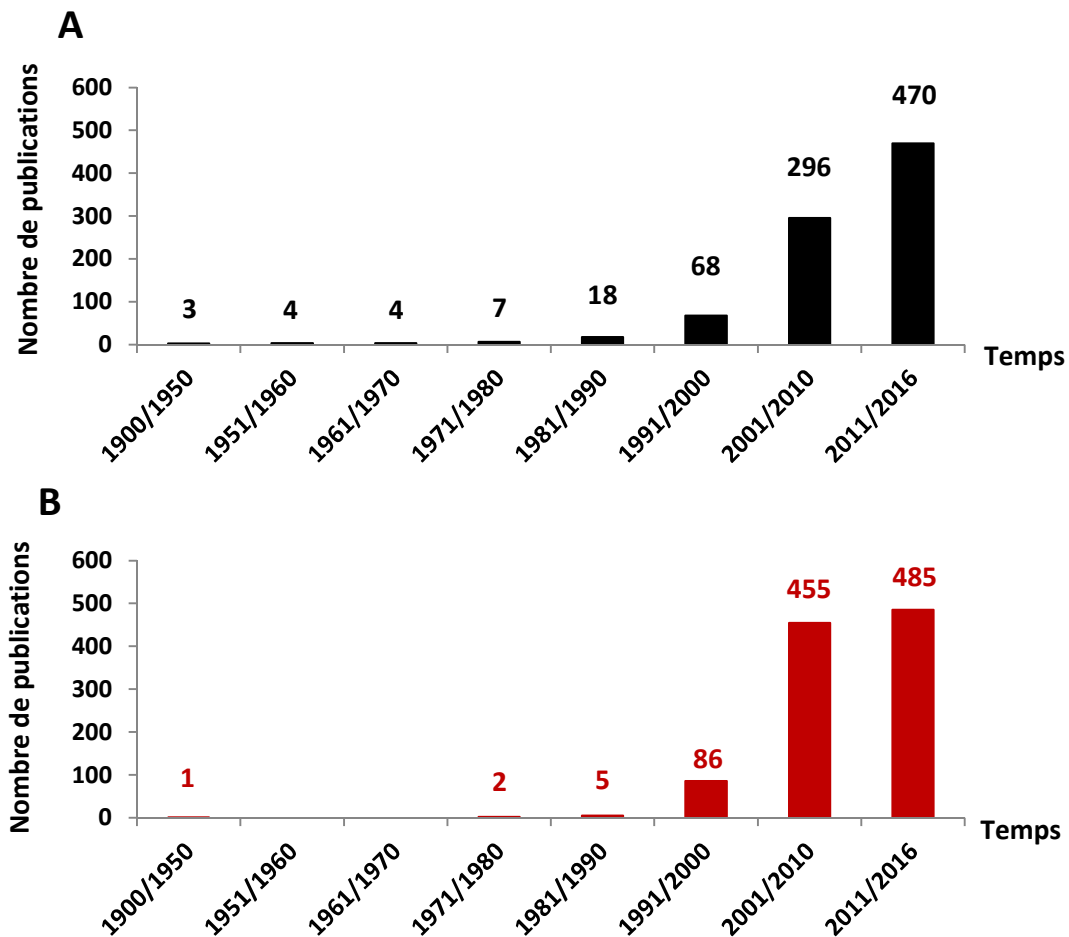
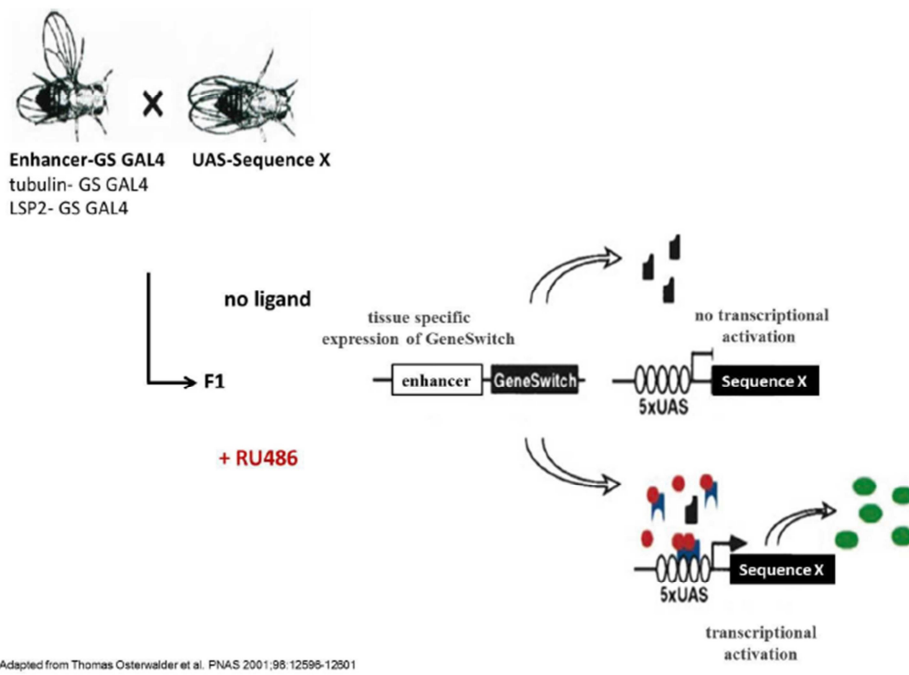


Figure 5 : Nombre de publications répertoriées dans Pubmed après une recherche dans le titre et/ou résumé des publications des termes « Insects Immunity » (A) et « Drosophila Immunity » (B). J'ai réalisé la recherche et la présentation du nombre de publications parues par décennie de 1951 à 2016 ou sur une période de 50 ans (1900 et 1950 compte tenu du nombre limité d'articles retrouvés lors de cette période). La première publication concernant globalement l'immunité des insectes (A) date de 1926 ; parue dans le journal « The journal of experimental medicine » et réalisée par Noguchi à l'institut Rockefeller pour la recherche médicale, elle s'intéresse à « Cultivation of Rickettsia-like microorganisms from the rocky mountain spotted fever tick, *Demercantor andersoni* ». La première publication spécifique à l'immunité de la drosophile (B) est, parue dans le journal « Journal of immunology » en 1949 et concerne « Immunogenetic studies of *Drosophila melanogaster*; the development of technics and the detection of strain differences ». Ces publications ne sont pas accessibles rapidement en ligne. Il est remarquable d'observer la multiplication par 5 des recherches sur la réponse immunitaire chez les insectes à partir de 2001.

De nombreuses études ont révélé une homologie significative entre la réponse immunitaire de la drosophile et la réponse immunitaire innée des mammifères. L'absence d'une réponse immunitaire adaptative a permis d'étudier spécifiquement les interactions entre des pathogènes et la réponse immunitaire innée de l'hôte. La drosophile est un modèle intéressant pour plusieurs raisons. Elle présente un temps de génération court (entre 12 jours à 25°C) et est facile à manipuler. On peut étudier de larges cohortes, ce qui permet des analyses statistiques robustes des données générées. Le génome de la drosophile est entièrement séquencé et pour l'essentiel il est non redondant [Adams *et al.* 2000 ; Celniker *et al.* 2002 ; Hoskins *et al.* 2007], et de nombreux mutants et outils génétiques sont disponibles pour analyser et/ou moduler l'activité des gènes [Adams and Sekelsky 2002 ; Venken and Bellen 2005]. Des technologies de transgénèse permettant l'activation ou l'inhibition de gènes *in vivo* de manière tissu spécifique et/ou contrôlée dans le temps existent [Rubin and Spradling 1983 ; Golic *et al.* 1997 ; Groth *et al.* 2004 ; Venken *et al.* 2006] (Figure 6). Grâce à ces outils génétiques, il a été possible d'exprimer directement *in vivo* chez la mouche des facteurs de virulence de pathogènes. Les gènes des pathogènes ont été exprimés de manière ubiquitaire [Yan *et al.* 2009] ou tissu-spécifique par exemple dans le corps gras [Leulier *et al.* 2003b], ou dans les disques imaginaux précurseurs des ailes [Guichard *et al.* 2006] ou des yeux [Adamson *et al.* 2005]. Ces méthodes ont permis l'identification des cellules de l'hôte ciblées par les protéines de pathogènes tels que les sporozoïtes du Plasmodium [Yan *et al.* 2009] et d'autres encore [Guichard *et al.* 2006 ; Adamson *et al.* 2005 ; Leulier *et al.* 2003].



Adapted from Thomas Osterwalder et al. PNAS 2001;98:12595-12591

Figure 6 : Le système conditionnel d'expression GeneSwitch. Le système GeneSwitch est similaire dans son principe au système bipartite UAS-GAL4 dans lequel la protéine de levure Gal4, activatrice de la transcription, exprimée selon un profil spatio-temporel contrôlé par une région cis régulatrice donnée (transgène enhancer-Gal4) se lie aux séquences UAS (Upstream Activated Sequence) et permet l'activation forte de la transcription d'une séquence X d'intérêt (transgène UAS- séquence X). Dans le système GeneSwitch, la protéine Gal4 est remplacée par une protéine de fusion contenant le domaine de liaison à l'ADN de GAL4, le domaine de liaison à la progestérone du récepteur à la progestérone et le domaine d'activation transcriptionnel de la protéine p65 (GeneSwitch Gal4, GS Gal4). GSGal4 est un facteur de transcription chimère. En absence de progestérone (RU486 ou encore mifepristone), la protéine GSGal4 n'est pas capable de lier les séquences UAS. En revanche, en présence du ligand RU486, GS Gal4 change de conformation et peut alors lier les séquences UAS (Upstream Activated Sequence). L'expression de GS Gal4 sous le contrôle d'un enhancer donné n'est donc capable d'induire l'expression d'une séquence sous contrôle des séquences UAS qu'en présence de RU486. Deux lignées sont croisées afin d'obtenir des individus (en F1) portant les deux transgènes Enhancer-GSGal4 et UAS-séquence X d'intérêt. La présence du ligand RU486 dans le milieu d'élevage conduit à l'activation du système GeneSwitch et induit ainsi l'inhibition d'un gène si la séquence d'intérêt code un ARN interférant, la surexpression d'un gène si la séquence d'intérêt code une protéine (sauvage ou mutante) ou l'expression forte d'un rapporteur d'expression si la séquence d'intérêt code par exemple la β Galactosidase ou une protéine fluorescente comme la GFP. Adapté de Osterwalder *et al.* 2001.

Les lignées de drosophile mutantes et transgéniques ont été utilisées massivement pour étudier les interactions entre les pathogènes et la drosophile. Les drosophiles mutantes pour les gènes de la réponse immunitaire et des études d'épistasie ont permis de comprendre leur rôle dans la réponse à l'infection face à de nombreux pathogènes de nature différente [Apidianakis *et al.* 2004 ; Lamaris *et al.* 2007 ; Chotkowski *et al.* 2008 ; Chen *et al.* 2010]. Les drosophiles transgéniques permettant de suivre l'expression d'un rapporteur (β -

galactosidase ou GFP) ont été utilisées pour observer et suivre l'activation des voies immunitaires en réponse à une infection. C'est en utilisant ce type de mouches transgéniques qu'il a été montré que lors d'une infection fongique de la larve ou de l'adulte, l'expression du peptide antimicrobien Drosomycine n'est pas exclusive aux cellules du corps gras puisque les cellules des barrières épithéliales l'expriment également et la sécrètent suggérant l'existence d'une réponse locale à l'infection [Ferrandon *et al.* 1998]. Autre exemple, il a été possible de suivre spécifiquement la production de peptides antimicrobiens chez l'adulte en réponse à une infection par la bactérie *Ehrlichia chaffeensis* en utilisant des transgènes exprimant la GFP sous le contrôle de promoteur rapportant l'expression de l'Attacine, la Diptéricine ou la Drosomycine) [Luce-Fedrow *et al.* 2009].

En plus des outils génétiques, les drosophilistes ont accès gratuitement à la base de données FlyBase, créée dès 1993 [Ashburner 1993] (<http://flybase.org/>) et intégrant les données de génétique et de génomique ainsi que des outils d'extraction de ces données [Tweedie *et al.* 2009].

Les modèles d'étude de l'infection chez la drosophile

Les cultures de lignées cellulaires de drosophile (les cellules S2 et mbn-2), les embryons, les larves et les adultes (mâle ou femelle) ont été utilisés pour étudier les interactions hôte/pathogène. Par exemple un modèle d'étude de l'infection par *P. asymbiotica* dans les embryons de drosophile a été créé afin de suivre, *in vivo* et en temps réel, l'interaction entre la bactérie et les hémocytes par microscopie confocale [Vlisidou *et al.* 2009]. Les larves de drosophile et les adultes ont été utilisés pour identifier et caractériser les facteurs de l'hôte et du pathogène qui activent ou inhibent les infections par des pathogènes tel que *P. gingivalis* [Igboin *et al.* 2011], *P. aeruginosa* [Chen *et al.* 2010 ; Lau *et al.* 2003 ; Kim *et al.* 2008], *V. cholera* [Berkey *et al.* 2009], *S. aureus* [Tabuchi *et al.* 2010] et *West Nile virus* [Chotkowski *et al.* 2008]. Des drosophiles adultes ont été utilisées dans plusieurs études afin de tester l'efficacité de drogues antifongiques [Lamaris *et al.* 2009 ; Lionakis *et al.* 2005] et antibactériennes [Broderick *et al.* 2006 ; Needham *et al.* 2004].

Les cellules S2 (Shneider 2 ; dérivé d'une culture d'embryons de drosophile de stade tardif) et mbn2 (lignée d'hémocytes isolée à partir de larves de drosophiles mutantes « malignant blood neoplasm ») sont utilisées comme modèles pour étudier les plasmacytes, car ces cellules sont immunocompétentes, ont la capacité de phagocyter et expriment de nombreux récepteurs scavenger spécifiques des plasmacytes. Les lignées cellulaires sont donc des outils efficaces pour l'étude de processus tels que la phagocytose, la prolifération cellulaire, la propagation d'un pathogène de cellule en cellule [Cheng *et al.* 2003 ; Hashimoto *et al.* 2009 ; Stroschein-Stevenson *et al.* 2006 ; Qin *et al.* 2011 ; Serio *et al.* 2010], ou encore pour identifier, grâce à un crible par ARN interférant (ARNi), les facteurs de l'hôte qui interagissent avec les pathogènes [Hao *et al.* 2008 ; Cronin *et al.* 2009 ; Agaisse 2008 ; Akimana *et al.* 2010 ; Agaisse *et al.* 2005 ; Sessions *et al.* 2009].

Les modes d'infection

Trois modes d'infection de la drosophile sont généralement utilisés: la pique, l'ingestion et le « rolling ». L'infection par pique introduit directement le pathogène dans l'organisme (larve, adulte). La pique est réalisée avec une minutie préalablement plongée dans une solution bactérienne. L'utilisation d'un nano-injecteur permet de contrôler la dose bactérienne injectée. L'ingestion de micro-organismes par les larves et les mouches adultes est considérée comme une infection naturelle. De petits disques de papier imbibés de la bactérie d'intérêt sont par exemple déposés sur le milieu de culture des mouches adultes.

Le « rolling » qui consiste à faire rouler l'animal (larve, adulte) dans une boîte de pétri contenant des spores, n'a été utilisé qu'avec des pathogènes d'origine fongique.

Le système immunitaire de *Drosophila melanogaster*

Dans cette partie, je concentre mon exposé sur la description du système immunitaire de *Drosophila melanogaster*, modèle que j'ai utilisé au cours de ma thèse pour étudier l'interaction inflammation/infection *in vivo*. Dans une première partie, j'expose les

deux aspects de l'immunité, cellulaire et humorale. Je détaille les voies de signalisation Toll et IMD, qui sont impliqués dans la réponse à l'infection chez la drosophile, ainsi que leurs régulations. Dans une deuxième partie, j'expose les mécanismes mis en jeu lors de l'induction d'une inflammation stérile dans ce modèle.

L'immunité cellulaire

A la fin du XIXe siècle, Elie Metchnikoff (1845 – 1916) a observé qu'après avoir planté une épine végétale dans une larve d'étoile de mer, des cellules mobiles de celle-ci s'agglutinent autour de l'épine avant de l'ingérer et la digérer. Ces cellules particulières, « amiboïdes », réagissaient donc à la présence d'un corps étranger et étaient capables de le phagocyter [Tan and Dee 2009]. Metchnikoff rejoignit l'institut Pasteur en 1888 et mit en évidence ce phénomène de phagocytose chez les insectes et les mammifères, dont l'homme chez qui certains globules blancs sont capables d'éliminer bactéries et débris de cellules mortes. Metchnikoff formule alors l'idée que la phagocytose est un processus général constituant un mécanisme de défense primordial contre les infections et introduit ainsi le concept d'immunité cellulaire.

Le système circulatoire de la drosophile est un système ouvert et ainsi, à l'intérieur du tégument, tous les organes baignent dans l'hémolymphe. L'hémolymphe assure notamment l'apport de nutriments aux tissus qu'elle irrigue, le transport de déchets métaboliques, le maintien de la turgescence des organes mous. L'hémolymphe ne contient pas de cellules circulantes impliquées dans le transport d'oxygène ; chez les insectes l'oxygène est en effet transporté directement aux cellules par le système trachéen. En revanche, les cellules circulantes dans l'hémolymphe, les hémocytes, ainsi que des molécules solubles microbiocides participent à la réponse immunitaire cellulaire et humorale ainsi qu'à la cicatrisation du tégument. Le développement des hémocytes se déroule en premier lieu au stade embryonnaire durant lequel naissent les plasmatocytes et les cellules à cristaux à partir du mésoderme procéphalique ; une deuxième vague d'hématopoïèse se produit chez la larve ; à ce stade, la glande lymphatique (lymph gland) d'origine mésodermique est le site principal de production des hémocytes ; c'est à ce stade que sont

produits également les lamellocytes. Ces cellules (Figure 7) ont des fonctions immunitaires de l'embryon à l'adulte, mais participent également au développement embryonnaire. Les hémocytes embryonnaires sécrètent des composants de matrice extracellulaire comme le collagène IV [Gullberg *et al.* 1994], la glutactine [Gullberg *et al.* 1994], la peroxidase [Nelson *et al.* 1994], ou la glycoprotéine liant la matrice extracellulaire SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) [Martinek *et al.* 2008]. Ces cellules participent au développement embryonnaire et par exemple, la perte de fonction de SPARC chez l'embryon conduit à de nombreux défauts de développement dont un défaut de condensation de la corde ventrale [Martinek *et al.* 2008 ; Defaye *et al.* 2009].

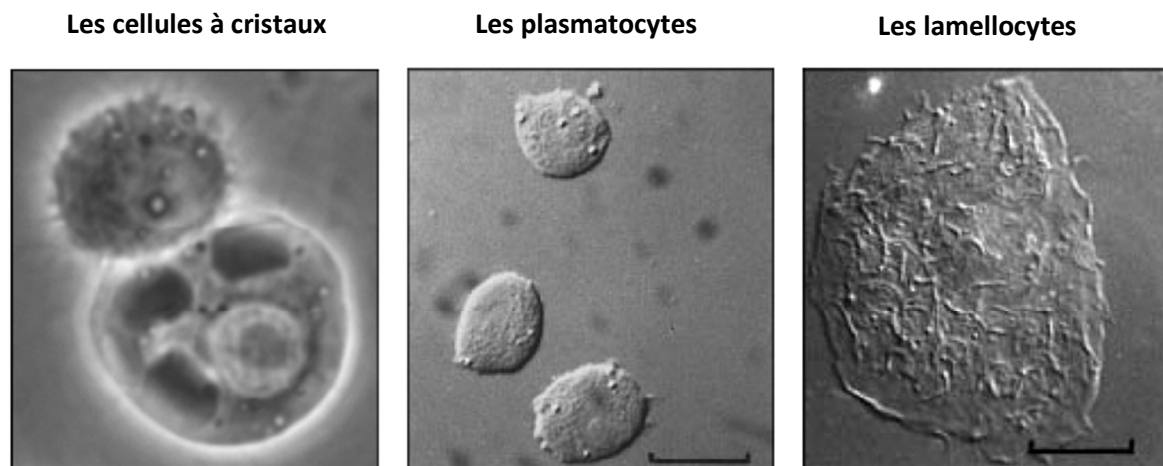


Figure 7 : Photos des trois types d'hémocytes prises en imagerie par contraste de phase. Il y a trois types d'hémocytes chez la larve : les cellules à cristaux (mélánisation), les plasmotocytes (phagocytose) et les lamellocytes (encapsulation). Le 1er type compte pour environ 5% de la population larvaire, le 2nd environ 95% et le 3e n'est produit qu'en cas de stress particulier, comme une infestation par un œuf de guêpe parasite, et peut dériver des plasmotocytes. Seuls les plasmotocytes sont retrouvés chez l'adulte. Barre d'échelle : 10µm.

Les trois types d'hémocytes sont décrits ci-dessous :

Les plasmotocytes :

Cellules de 10-15µm de diamètre, les plasmotocytes présent à tous les stades de développement représentent 95% des hémocytes circulants chez la larve et sont le seul type

d'hémocyte présent chez l'adulte. Les plasmatoctes sont les seuls hémocytes capables de phagocytose chez la drosophile et peuvent s'apparenter du point de vue structural et fonctionnel au monocytes/macrophages des mammifères. Capables de synthèse intense de protéines structurales de la matrice extracellulaire qui entoure les organes, comme le collagène et la Peroxydasine (Pxn) [Fessler *et al.* 1994], ces cellules sont des acteurs importants dans le remodelage des tissus au cours du développement [Defaye *et al.* 2009]. Les plasmatoctes assurent la phagocytose des cellules apoptotiques au cours du développement embryonnaire mais ne sont pas indispensables à l'élimination des tissus histolysés au cours de la métamorphose comme il a été longtemps proposé. En effet, une étude *in vivo* récente a montré que l'absence des plasmatoctes à partir du premier stade larvaire (par surexpression de la protéine apoptotique Hid spécifiquement dans ces cellules) n'empêche pas la naissance d'adultes qui en outre ne présentent pas de défaut phénotypiques, dans un laps normal de temps [Charroux and Royet 2009]. Chez la puppe, ces cellules englobent et recyclent les cellules condamnées.

Chez la larve et l'adulte, les plasmatoctes contribuent aux défenses immunitaires suite à une infection en phagocytant les agents infectieux de petite taille (bactéries à Gram-positif, Gram-négatif ou champignons). La haute sensibilité à l'infection aux micro-organismes en absence des plasmatoctes, qui est due à l'absence de phagocytose et par conséquent une prolifération excessive de l'agent pathogène, existe en dépit d'une production à un taux normal par le corps gras de peptides antimicrobiens, chez l'adulte en tout cas [Charroux and Royet, 2009]. Enfin, les plasmatoctes synthétisent et sécrètent des peptides antimicrobiens (AMPs) [Dimarcq *et al.* 1997] et préviennent le développement d'infections bactériennes.

Les plasmatoctes sont également recrutés au site de blessure dans l'embryon de la drosophile, ce qui peut être visualisé par exemple en observant des embryons transgéniques exprimant des protéines fluorescentes spécifiquement dans les hémocytes et dans l'épithélium après avoir réalisé une blessure au laser de 40 µm de diamètre au niveau de l'épithélium ventral [Stramer *et al.* 2005] (Figure 8).

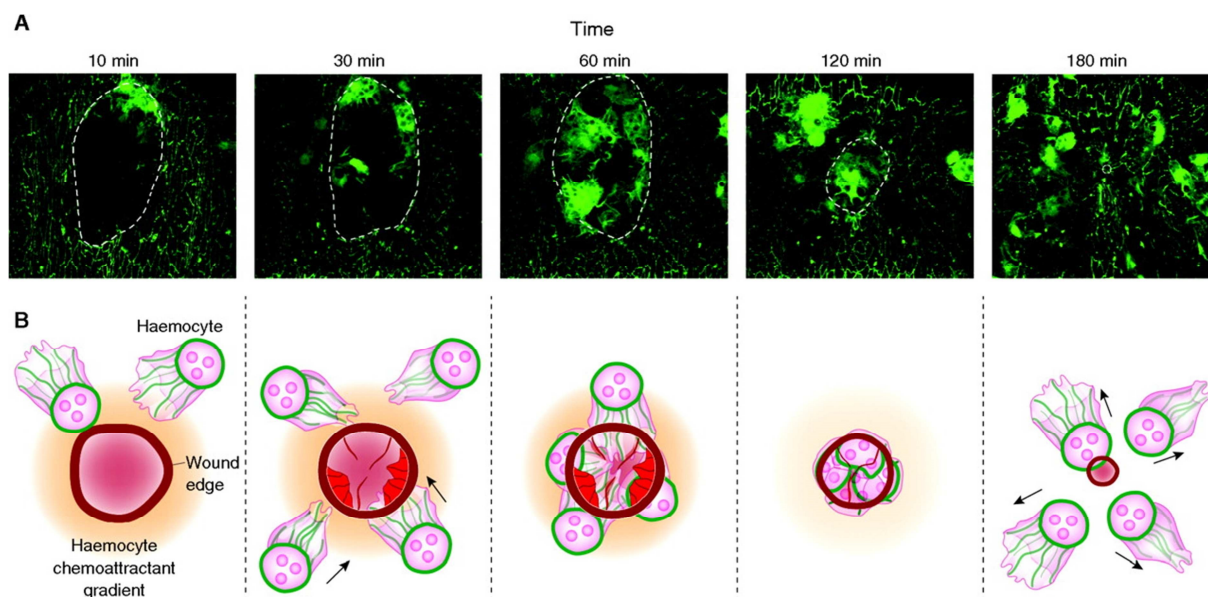


Figure 8: La migration des plasmatocytes au site de blessure chez l'embryon de la drosophile. A) Image obtenue par microscope confocale montrant le recrutement des hémocytes au site blessure sur un intervalle de temps de 180 minutes post-blessure. Les tirets délimitent la zone de blessure. Adapté de Stramer *et al.* 2005. B) Représentation schématique du recrutement des hémocytes au site de blessure. Les cellules épithéliales situées au bord de la blessure assemblent rapidement un câble d'actomyosine ainsi que des lamelles dynamique et des filopodes (cercle en gras et structure rouge en forme de doigt). La blessure induit également la production de peroxyde d'hydrogène (gradient orange), chémoattractant pour les hémocytes. Ceux-ci vont s'accumuler au bord de la blessure avant d'en coloniser le cœur. A la cicatrisation de la blessure et la réduction du gradient de peroxyde d'hydrogène, les hémocytes retournent à leur fonction développementale. Adapté de Razzell *et al.* 2011.

Les « crystal cells » :

Les crystal cells, ou cellules à cristaux, apparaissent au stade embryonnaire, et sont retrouvées chez la larve, représentant alors environ 5% des hémocytes circulants. Cette population disparaît au cours de la métamorphose, et n'est plus présente chez les adultes [lanot *et al.* 2001]. Ces cellules tirent leur nom des enzymes et substrats qu'elles contiennent en forte concentration dans leur cytoplasme et qui se présentent sous forme d'inclusions. Ces enzymes, les phénoloxydases libérées dans l'hémolymphe après la lyse des cellules à cristaux sont des acteurs clé du processus de mélanisation pendant lequel les phénols sont oxydés en quinones qui polymérisent pour former la mélanine. Ces oxydoréductases, qui catalysent la conversion de la dopamine en mélanine, sont synthétisées généralement sous forme de zymogène inactif (pro-phénoloxidase) et clivées suite à l'activation d'une cascade de sérine protéase suite à une infection après une blessure. Ce processus de défense activé

très rapidement conduit au dépôt de mélanine autour du microorganisme et aide à le séquestrer au site de blessure. Les dérivés de quinones et les espèces réactives de l'oxygène sont pensés comme toxiques pour les microorganismes. La réaction de mélanisation est contrôlée par des inhibiteurs de sérine protéases, les Serpines, qui permettent de localiser la réaction strictement au site d'infection ou de blessure. Cette régulation est très importante puisque une réaction de mélanisation dérégulée génère des intermédiaires toxiques qui peuvent tuer l'hôte ainsi que le montre la létalité obtenue pour des individus mutants pour les Serpines chez lesquels le processus de mélanisation est inhibé [Meister and Lagueux 2003]. Ce processus est impliqué dans la défense contre le pathogène mais coopère avec et affecte d'autres mécanismes de réponse immunitaire comme l'encapsulation, la production de peptides antimicrobiens ainsi que la cicatrisation des blessures [Cerenius et al. 2008].

Les lamellocytes :

La troisième classe, les lamellocytes, sont des cellules plates et adhésives qui vont permettre l'encapsulation de pathogènes trop larges pour être phagocytés par les plasmacytes [Lemaitre and Hoffmann, 2007]. Ce phénomène conduit à l'accumulation de ces cellules, ainsi que des cellules à cristaux, qui forment une capsule mélanisée autour du pathogène, limitant ainsi son développement [Krzemien *et al.* 2010]. Ces cellules ne se différencient que chez la larve en réponse à certains défis immunitaires, comme par exemple lors d'infestation par des œufs de guêpe parasitoïde ou d'une condition de stress relative par exemple à une augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à une blessure.

Un processus complexe de coagulation est mis en place pour limiter la perte d'hémolymphe au site de blessure et permet de reconstituer rapidement une seconde barrière et limiter l'entrée d'éléments exogènes dans l'organisme [Theopold *et al.* 2014]. Les deux types d'hémocytes contribuent à la formation du caillot dans lequel le micro-organisme est incorporé, les plasmacytes qui synthétisent notamment la protéine Hemolectin (Hmn) et les cellules à cristaux qui contiennent des pro-phénoloxidasés. [Lemaitre and Hoffmann 2007 ; Theopold *et al.* 2004].

L'immunité humorale

Au début du XXe siècle, les principaux acteurs de l'immunité humorale étaient Paul Ehrlich (1854 -1915) et Emil Adolf von Behring (1854 - 1917). En 1890 von Behring fit la découverte de l'existence d'une antitoxine contre la toxine diphtérique dans le sérum d'individus ayant survécu à la diphtérie, ce qui lui valut un prix nobel en 1901. C'est en 1894 que von Behring et Ehrlich ont développé un traitement anti diphtérique, ce qui valut un prix nobel à Ehrlich en 1894 (avec Ilya Ilyich Mechnikov).

Les peptides antimicrobiens (AMPs)

En 1972, Boman observa chez la drosophile qu'une infection bactérienne conduit à la production de molécules antibactériennes, qui ont été identifiées comme étant des peptides et sont appelées les peptides antimicrobiens [Boman *et al.* 1972]. .

Tous les gènes codent des protéines possédant une séquence signal permettant leur sécrétion dans l'hémolymphe.

Les gènes codant les AMPs sont généralement de petits gènes dépourvus d'introns dispersés à différentes positions dans le génome. Une exception, les 4 gènes codant la Cecropine localisés dans un complexe de gènes et qui possèdent un intron. On dénombre sept familles d'AMPs chez la Drosophile (Figure 9). Ces AMPs sont classiquement définis comme des peptides cationiques et amphipatiques, présentant un large spectre d'activité microbicide associée à une perméabilisation membranaire

Les AMPs ne sont pas exprimés en condition normale mais sont fortement exprimés en réponse à une infection microbienne. Ces peptides sont principalement synthétisés et sécrétés par le corps gras (équivalent du foie chez les mammifères) mais aussi par certains hémocytes comme les plasmotocytes. Cette réaction montre des similitudes avec la synthèse des protéines sécrétées rapidement par le foie suite à une infection chez les mammifères. Dans les cellules du corps gras, après un événement infectieux, la concentration des AMPs passe d'un niveau initial à peine détectable à des niveaux très élevés, pouvant, par exemple, multiplier par 2000 fois l'expression de la Diptéricine. De façon globale, après infection, les

AMPs sont présents dans l'hémolymphe en quantité variable (de 0,5 à 100 µmol/L) [Lemaitre and Hoffmann 2007].

Peptides	Nombre de gènes	Activité principale
Diptéricine	2	Bactéries à Gram-négatif
Attacine	4	Bactéries à Gram-négatif
Drosocine	1	Bactéries à Gram-négatif
Cécropine	4	Bactéries à Gram-négatif
Défensine	1	Bactéries à Gram-positif
Drosomycine	7	Champignons
Metchnikowine	1	Champignons

Figure 9 : Les différentes familles d'AMP chez la Drosophile. Le nombre de gènes codants les AMPs et leurs cibles principales sont indiqués. Adapté de Lemaitre, 2007.

Une induction sous le contrôle des voies Toll et « immune deficiency » IMD

Les deux voies de signalisation, Toll et IMD, menant à la forte production de ces AMPs, ont été découvertes dans les années 1990 et impliquent toutes deux l'activation de facteurs de transcription de type NF-κB. Chacune de ces voies est activée préférentiellement en réponse à une infection par un type de micro-organisme. La voie Toll répond aux infections par des champignons et par des bactéries à Gram-positif principalement, et active

en particulier la production de Drosomycine [Lemaitre *et al.* 1996]. La découverte de l'implication de la voie Toll dans l'immunité a eu un grand impact, puisqu'elle a été un indice déterminant vers la découverte des fonctions des récepteurs TLR des vertébrés.

La voie Toll : réponses aux infections fongiques ou de bactéries à Gram-positif

Le rôle de la voie Toll a été exploré au cours du développement embryonnaire pendant lequel elle joue un rôle dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon [Belvin and Anderson 1996] et impliquée dans l'immunité. En effet, les mutants perte de fonction pour des acteurs de la voie Toll après une infection bactérienne à Gram-positif ou fongique, montrent une synthèse de l'AMP Drosomycine très faible et sont plus susceptibles à l'infection qu'un individu sauvage [Lemaitre *et al.* 1996].

La voie de signalisation Toll, homologue de la voie Toll/IL-1 chez les mammifères, est bien caractérisée (Figure 10). L'activation cette voie de signalisation est médiée par le récepteur transmembranaire Toll qui contrairement au récepteur TLR (Toll Like Receptor) de mammifère ne reconnaît pas directement l'agent infectieux. Des molécules particulières, comme par exemple des peptidoglycanes sécrétés par les bactéries Gram-positives et dont le taux est d'autant plus important que les bactéries se divisent, sont spécifiquement détectées par des molécules de reconnaissance circulantes. Cette reconnaissance induit une cascade protéolytique de protéases à sérine qui aboutit au clivage et à l'activation de la cytokine Spätzle capable de lier le récepteur Toll et induire sa dimérisation (figure 10). L'activation de Toll résulte dans le recrutement de trois protéines, la protéine adaptatrice dMyD88, homologue de la protéine Myeloid differentiation 88 de mammifère [Tauszig-Delamasure *et al.* 2002] et les kinases Tube et Pelle, homologues des kinases IRAK chez les mammifères [Hornig and Medzhitov 2001 ; Sun *et al.* 2002 ; Sun *et al.* 2004]. Le complexe activé entraîne la phosphorylation et la dégradation de Cactus, homologue d'I κ B (inhibiteur de Kappa B), libérant ainsi dans le cytoplasme les protéines de la famille NF- κ B Dorsal et Dif (Dorsal-related immune factor). La translocation dans le noyau de ces facteurs de transcription conduit enfin à l'expression des gènes codant les AMPs.

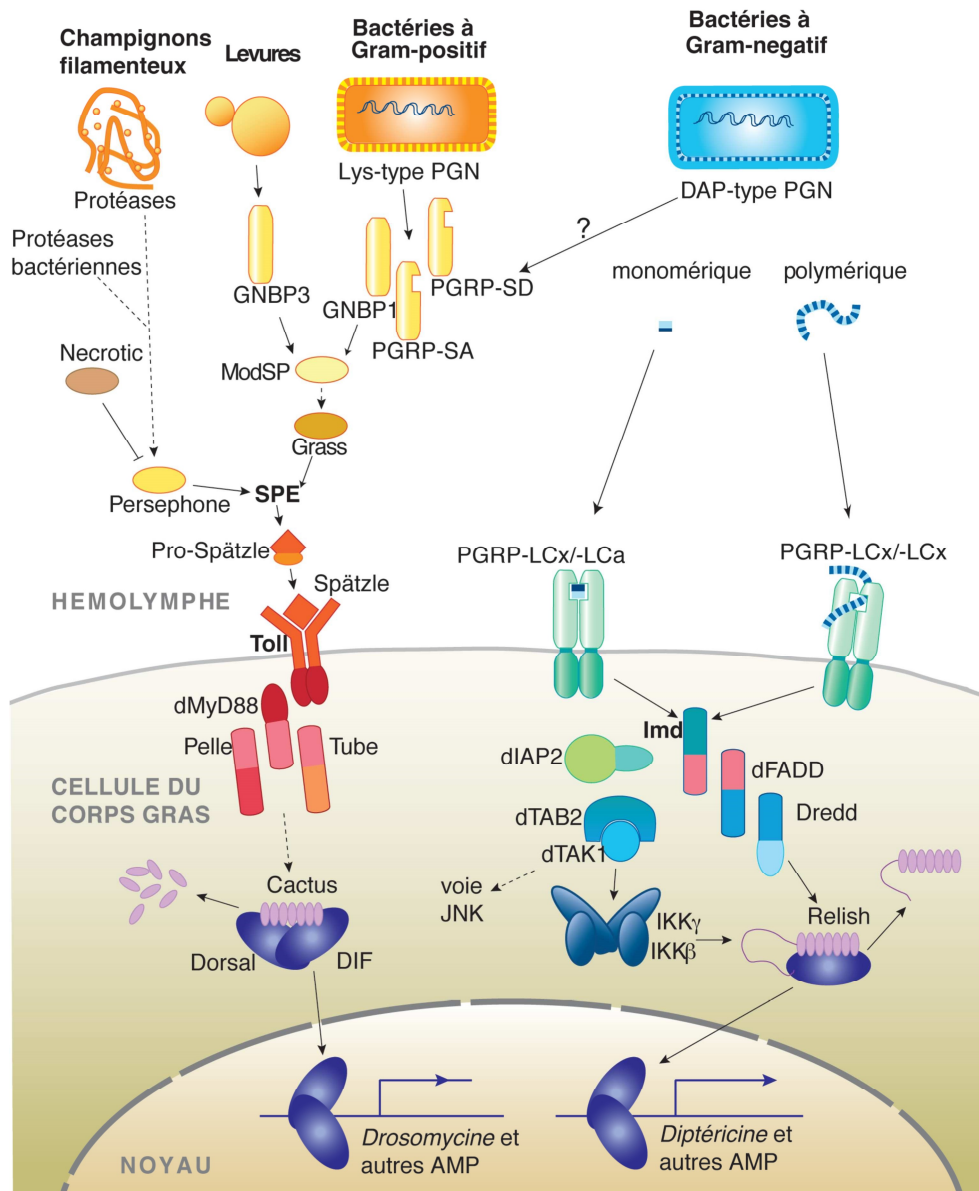


Figure 10 : Les voies de signalisation Toll et IMD de la drosophile. La voie Toll peut être activée de deux manières indépendantes. Le peptidoglycane de type Lysine, caractéristique de la majorité des bactéries à Gram-positif, est reconnu par les récepteurs PGRP-SA/ GGBP1 et PGRP-SD et induit l'activation d'une cascade protéolytique impliquant ModSP, Grass et SPE requise pour le clivage de Pro-Spätzle en la cytokine active Spätzle liée par le récepteur Toll. SPE peut aussi être activée suite à la reconnaissance de β (1-3) glucans, polymère constituant la paroi cellulaire des champignons, par le récepteur circulant GGBP3; la protéase à sérine Persephone est impliquée dans l'activation de SPE par les protéases sécrétées par les champignons filamenteux entomopathogènes et son activité peut être inhibée par la protéine Necrotic. Le récepteur Toll activé recrute l'adaptateur dMyD88, et les kinases Tube et Pelle dont l'activation induit la phosphorylation de Cactus qui, dégradée, libère les protéines Dorsal et DIF. Ces deux facteurs de transcriptions transloquent alors dans le noyau et induisent l'expression de certains AMP, comme la Drosomycine. Le peptidoglycane de type DAP polymérique est reconnu par le récepteur membranaire PGRP-LCx tandis que celui de type DAP monomérique est reconnu par PGRP-LCx / PGRP-LCa. L'activation du récepteur PGRP-LC induit le recrutement des adaptateurs IMD et dFADD et de la caspase DREDD. IMD, clivé par DREDD, est reconnue par dIAP2 et va activer dTak1. Ceci va conduire à la phosphorylation du facteur de transcription Relish. Celui-ci va être clivé et séparé de son domaine inhibiteur. Le facteur entre ainsi dans le noyau et permet l'expression de certains AMPs tel que la Diptéricine. Adapté de Lemaitre *et al.* 2007.

La voie IMD : réponses aux infections par des bactéries à Gram-négatif

La voie IMD est stimulée par la reconnaissance d'un peptidoglycane dérivé majoritairement des bactéries à Gram-négatif par le récepteur membranaire PGRP-LC (Peptidoglycan Recognition Protein-LC) (Figure 10) [Gottar *et al.* 2002; Leulier *et al.* 2003]. Le récepteur recrute l'adaptateur IMD, homologue de RIP1 chez les mammifères, point de départ de deux voies de signalisation résultant en la phosphorylation et le clivage du facteur de transcription Relish (Rel), homologue de NF- κ B [Hedengren *et al.* 1999]. La protéine IMD associée au récepteur recrute l'adaptateur dFADD, homologue de FADD chez les mammifères [Naitza *et al.* 2002] et la caspase DREDD, homologue de la caspase-8 chez les mammifères [Hu and Yang 2000 ; Leulier *et al.* 2002]. DREDD clive alors IMD qui est ainsi reconnue par DIAP2 [Paquette *et al.* 2010]. DIAP2 induit l'ubiquitination multiple d'IMD, une réaction identique à celle observée chez les mammifères au niveau des protéines RIP1 et TRAF6 dans les voies de signalisation TNFR et IL-1R respectivement [Ea *et al.* 2006 ; Lamothe *et al.* 2007]. La poly-ubiquitination d'IMD, de manière similaire à ce qui est observé dans les voies de signalisation NF-KB des mammifères, permet le recrutement et l'activation des complexes TAB2/TAK1 (TAK1-associated binding protein 2/TGF- β activated kinase 1) et IKK (I κ B Kinase) [Kanayama *et al.* 2004 ; Zhuang *et al.* 2006 ; Bianchi and Meier 2009 ; Iwai and Tokunaga 2009] conduisant à la phosphorylation de Relish, homologue de p105 chez les vertébrés [Vidal *et al.* 2001 ; Silverman *et al.* 2003 ; Stoven *et al.* 2003 ; Ertuk-Hasdemir *et al.* 2009]. Relish phosphorylée est clivée par la caspase DREDD, la partie N-terminale de Relish (Rel68) contenant le domaine RHD (Rel homology domain) est transloquée dans le noyau tandis que la partie C-terminale (Rel49), jouant un rôle d'inhibiteur, reste dans le cytoplasme [Stoven *et al.* 2003]. La phosphorylation de Relish n'est pas indispensable pour son clivage, mais est importante pour sa fonction de facteur de transcription dans le noyau car elle facilite le recrutement de l'ARN polymérase II au site de début de transcription du gène de l'AMP Diptéricine par exemple [Ertuk-Hasdemir *et al.* 2009].

Spécificité de réponses ?

Même s'il existe une spécificité de la réponse à l'infection dépendante de la nature de l'agent pathogène, les voies Toll et IMD ne sont pas complètement exclusives. Ainsi, la

plupart des gènes codant pour des AMPs sont régulés à la fois par Toll et IMD selon un dosage particulier. Par exemple, l'expression de la Drosomycine après une infection de nature fongique est abolie chez un mutant *spätzle* de la voie Toll, mais également chez un mutant *Relish* de la voie IMD [De Gregorio *et al.* 2002].

Par ailleurs, d'autres voies de transduction agissent dans la réponse à l'infection systémique. C'est le cas de la voie JNK (Jun N-terminal kinase) qui est induite par l'un des composants de la voie IMD : la MAP kinase kinase kinase Tak1 (TGF- β Activated Kinase 1) [Silverman *et al.* 2003]. Cette voie active l'expression de gènes agissant dans le remodelage du cytosquelette, mais elle a aussi été impliquée dans le processus d'expression des AMP par le corps gras [Delaney *et al.* 2006].

L'initiation des voies Toll et IMD

La voie Toll peut être activée : - par la reconnaissance de signaux de danger regroupés sous le terme DAMP (Danger Associated Molecular Pattern dont je parlerai dans la partie « Inflammation stérile chez la drosophile » page 40) et – par la reconnaissance de signaux pathogéniques appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), motifs conservés exprimés par les microorganismes pathogènes.

Des composants de la paroi microbienne, les β -glucanes fongiques et le peptidoglycane bactérien, sont reconnus par des récepteurs libres dans l'hémolymphe. La reconnaissance des composants des parois fongiques implique le récepteur GNB3 (Gram-Negative Binding Protein 3), tandis que le complexe PGRP-SA/GNB1 reconnaît le peptidoglycane bactérien [Gobert *et al.* 2003 ; Gottar *et al.* 2006]. A cette reconnaissance, on observe une autoactivation de la protéase à sérine ModSP qui va induire une cascade protéolytique conduisant au clivage de pro-Spz en Spz [Buchon *et al.* 2009]. Par ailleurs, la sécrétion de protéases dans le milieu par certains champignons et certaines bactéries peut activer la voie Toll par clivage de la protéase à sérine Perséphone (Psh) [EL Chamy *et al.* 2008 ; Ligoxygakis *et al.* 2002a]. Dans cas-là, les facteurs de virulence sont détectés par le biais de leur activité sur l'hôte.

La voie IMD est, quant à elle, directement induite par la reconnaissance du peptidoglycane et en particulier par le récepteur membranaire PGRP-LC.

Reconnaissance du peptidoglycane bactérien

Structure du peptidoglycane

Toutes les bactéries possèdent une paroi, structure rigide de nature polymérique. Si la nature des polymères est variable selon les bactéries, il en est un retrouvé systématiquement, le peptidoglycane (Figure 11). Ce polymère forme un réseau constitué de chaînes glucidiques reliées par leurs chaînes latérales oligopeptidiques (4 acides aminés) grâce à des ponts interpeptidiques. Chez les bactéries dites à Gram-positif, la membrane plasmique est protégée par de nombreuses couches de peptidoglycane qui forment une paroi très épaisse directement en contact avec le milieu extracellulaire. Chez les bactéries à Gram-négatif, le peptidoglycane forme une à deux couches et est enchâssé entre la membrane plasmique et une membrane externe contenant des lipopolysaccharides (LPS). C'est d'ailleurs cette différence entre les parois bactériennes qui est mise en évidence par la coloration de Gram. La paroi protège mécaniquement la bactérie contre sa pression osmotique interne, confère et permet le maintien de sa forme et, principal PAMP, joue un rôle déterminant dans l'induction de la réponse immunitaire chez la drosophile [Cloud-Hansen *et al.* 2006].

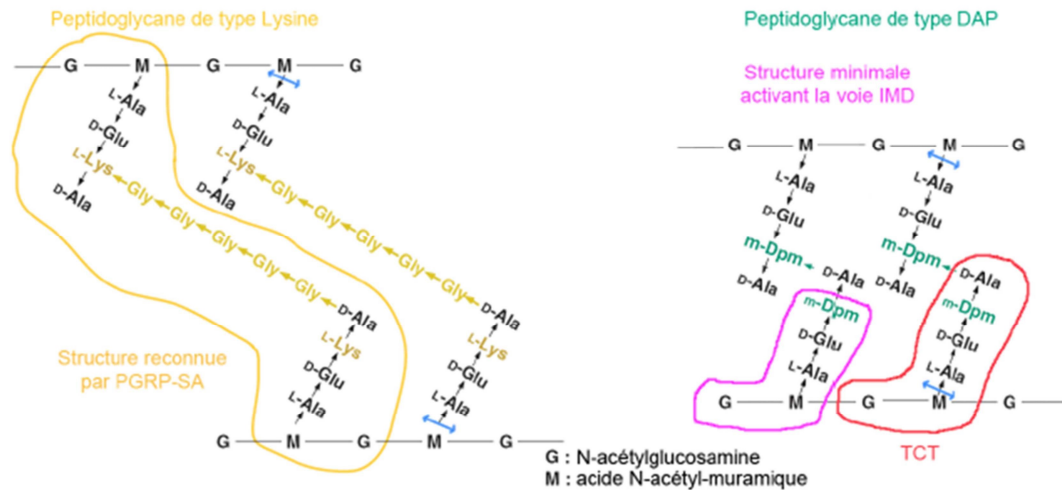


Figure 11: Structure des deux types de peptidoglycans. Le peptidoglycane de type lysine est généralement retrouvé chez les bactéries à Gram-positif tandis que chez les bactéries à Gram-négatif, on retrouve celui de type DAP. Les flèches bleues indiquent les sites de coupure par les PGRPs (voir section suivante) ayant conservé une activité d'amidase (voir Tableau 2). TCT : cytotoxine trachéale, impliquée dans l'activation de PGRP-LC. Adapté de Kurata *et al.* 2006.

Les PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein).

La distinction entre les deux types de bactéries est effectuée par l'intermédiaire les protéines de la famille des PGRP (Peptidoglycan Recognition Proteins) qui reconnaissent préférentiellement un peptidoglycane de type lysine présent chez de très nombreuses bactérie à Gram positif ou un type de peptidoglycane contenant de l'acide diaminopimélique (DAP) présent dans toutes les bactéries à Gram négatif (et certaines souches à Gram positif) (Figure 11). Cette reconnaissance particulière permet l'induction des voies Toll et IMD respectivement [Charroux *et al.* 2009].

Il existe 13 gènes codant des PGRPs différents, épissés en 19 protéines, chez la drosophile classifiables par leur longueur : les PGRP-L (longs) et les PGRP-S (courts) [Werner *et al.* 2000] (Tableau 2) et distinguables aussi par leur capacité dégrader ou pas le peptidoglycane après l'avoir reconnu [Mellroth *et al.* 2003 ; Zaidman-Remy *et al.* 2006].

Tableau 2 : Sites d'expression et fonctions des PGRPs chez la drosophile et l'homme. Adapté de Royet et Dziarski 2007

PGRP	Site d'expression	Fonction
<i>Drosophila melanogaster</i>		
PGRP-LA-C	Hémocytes	ND
PGRP-LA-D (a)	Hémocytes	ND
PGRP-LA-E	Hémocytes	ND
PGRP-LA-F (b)	Hémocytes	ND
PGRP-LB-A	Corps gras (induit), hémolymph	Amidase
PGRP-LB-B	Corps gras (induit), hémolymph	Amidase
PGRP-LB-C	Corps gras (induit), hémolymph	Amidase
PGRP-LC-A (x)	Hémocytes, corps gras	Activation de la voie IMD, Phagocytose
PGRP-LC-B (a)	Hémocytes, corps gras	Activation de la voie IMD
PGRP-LC-C (y)	Hémocytes, corps gras	Activation de la voie IMD
PGRP-LD-A	Hémocytes	ND
PGRP-LE	Intestin, hémocytes, hémolymph, trachée	Activation de la voie IMD, activation PPO
PGRP-LF	ND	ND
PGRP-SA	Corps gras, hémolymph, épiderme	Activation de la voie Toll, carboxypeptidase, phagocytose
PGRP-SB1	Corps gras (induit), hémolymph	Amidase, bactéricide
PGRP-SB2	ND	Amidase
PGRP-SC1a	Intestin	Amidase, activation de la voie Toll, phagocytose
PGRP-SC1b	Intestin	Amidase
PGRP-SC2	Intestin, corps gras (induit)	Amidase
PGRP-SD	Corps gras (induit), hémolymph	Activation de la voie Toll
<i>Human</i>		
PGLYRP-1 (PGRP-S)	Granulocytes	Bactéricide
PGLYRP-2 (PGRP-L)	Foie (sécrétion dans le sang), cellules épithéliales	Amidase
PGLYRP-3 (PGRP-I α)	Peau, glandes sudoripares, glandes sébacées, tractus intestinal, œil, bouche	Bactéricide
PGLYRP-4 (PGRP-I β)	Peau, glandes sudoripares, glandes sébacées, tractus intestinal, œil, bouche	Bactéricide

Nomenclature actuelle pour les isoformes (-A, -B) des PGRP-LA, -LB, et -LC chez la drosophile. L'ancienne nomenclature pour ces isoformes est indiquée en petit caractères entre parenthèses. ND = non déterminé. PPO = prophénoloxydase

Dans la voie de signalisation Toll, la reconnaissance des peptidoglycanes bactériens met en jeu deux récepteurs circulants dans l'hémolymphe: PGRP-SA et PGRP-SD (Figure 10). La reconnaissance de certains peptidoglycanes de type Lysine requiert de manière spécifique le récepteur PGRP-SA tandis que d'autres peuvent être reconnu par les deux récepteurs [Bischoff *et al.* 2004]. Cette reconnaissance nécessite une troisième protéine : GGBP1. Plusieurs études ont montré que cette protéine est requise pour la reconnaissance par les récepteurs de la voie Toll des peptidoglycanes de type Lysine [Gobert *et al.* 2003 ; Pili-Floury *et al.* 2004].

Dans la voie de signalisation IMD, la détection du peptidoglycane de type DAP, constituant les parois de toutes les bactéries Gram négatives, est réalisée par deux formes longues de PGRP : PGRP-LC et PGRP-LE [Choe *et al.* 2002 ; Gottar *et al.* 2002 ; Ramet *et al.* 2002 ; Takehana *et al.* 2004 ; Leulier *et al.* 2003 ; Kaneko *et al.* 2006]. Des drosophiles double mutantes pour PGRP-LC et PGRP-LE ne sont pas capable d'induire l'expression d'AMPs en réponse à une infection bactérienne de type Gram négative et sont ainsi hautement susceptibles à ce type d'infection [Takehana *et al.* 2004].

PGRP-LC est le récepteur transmembranaire principal de l'activation de la voie IMD [Kaneko *et al.* 2006 ; Yano *et al.* 2008]. Le gène PGRP-LC code pour 3 récepteurs différents obtenus par épissage alternatif : PGRP-LCx, PGRP-LCy et PGRP-LCa [Werner *et al.* 2003]. Chacun de ces récepteurs possède un domaine extracellulaire unique fusionné à un domaine de signalisation intracellulaire commun et identique. On ne connaît pas le(s) ligand(s) de PGRP-LCy. En revanche, l'activation de la voie de signalisation IMD par PGRP-LCx et -Lca est bien décrite. PGRP-LCx est suffisant pour la reconnaissance des PGN de type polymérique tandis que l'hétérodimère PGRP-LCx et PGRP-LCa est formé par la reconnaissance des fragments de PGN de type monomérique connues sous le nom de cytotoxine trachéale ou TCT [Werner *et al.* 2003 ; Kaneko *et al.* 2004 ; Whalen and Steward 1993 ; Chang *et al.* 2005 ; Mellroth *et al.* 2005]. La forme entière de PGRP-LE fonctionne comme un récepteur intracellulaire [Kaneko *et al.* 2006 ; Yano *et al.* 2008] qui reconnaît aussi la TCT à l'intérieur de la cellule. Une forme extracellulaire de PGRP-LE ne contenant que le domaine PGRP permet, avec PGRP-LC, la reconnaissance du peptidoglycane à la surface des cellules [Kaneko *et al.* 2006].

La régulation négative de la réponse

Une réponse immunitaire non contrôlée peut avoir un effet délétère et affecter jusqu'à la survie d'un organisme. Ainsi, la localisation, l'intensité et la durée de cette réponse doivent être finement contrôlées.

Régulation de la voie Toll

Au niveau de l'initiation de la réponse

Les cascades de protéases à sérine, à l'origine entre autre de l'activation de la voie Toll (Figure 4), sont régulées par des protéines de la famille des Serpines (Serine-protease inhibitors), dont Necrotic (Nec) est un membre (Figure 10). Les mutants perte de fonction *nec* affichent une activation constitutive de la voie Toll, une production d'AMP (Drosomycine) et des activités de mélanisation [Levashina *et al.* 1999 ; Ligoxygakis *et al.* 2002]. L'activation de la voie Toll entraîne le clivage de Nec en éliminant son extension polyglutamine N-terminal qui ainsi peut inhiber, au niveau de Persephone, la cascade protéolytique conduisant à l'activation de la cytokine Spätzle [Pelte *et al.* 2006].

Au niveau de la transduction du signal

Cactus/I κ B ainsi que WntD (inhibiteur de Dorsal, membre de la famille des facteurs de croissance Wnt) sont des inhibiteurs intracellulaire de la voie de signalisation Toll [Nicolas *et al.* 1998 ; Ganguly *et al.* 2005 ; Gordon *et al.* 2005]. En absence de signal infectieux, la protéine Cactus séquestre les protéines Dorsal ou Dif dans le cytoplasme, ne pouvant pas exercer leur rôle d'activateur de transcription de leurs gènes cibles (Figure 10). Récemment, WntD a été montré comme exerçant un rôle de répresseur de la voie Toll *via* Dorsal/NF- κ B non seulement au cours du développement embryonnaire en affectant la translocation de Dorsal mais aussi dans la réponse immunitaire et cela sans affecter la signalisation par Dif. Les mutants nuls de *wntD* sont viables et donnent naissance à des adultes fertiles dont 1 à 2% peuvent présenter des sites ectopiques de mélanisation. Cette observation suggère que le facteur WntD est important pour maintenir un niveau de base

faible de la signalisation Toll-Dorsal. D'ailleurs, après infection par des bactéries Gram-positives (*Micrococcus luteus*), les mouches mutantes pour *wntD* présentent une augmentation de l'expression de gènes codant certains AMPs ; ainsi la Diptéricine et la Défensine voient leur expression basale respectivement très fortement et moyennement augmentée alors que celle de la Drosomycine n'est pas affectée.

Cette variation d'expression des gènes codants des AMPs est corrélée à la capacité des mouches à combattre une infection. En effet, une infection par le pathogène létal *Listeria monocytogenes* entraîne une très forte mortalité des mouches mutantes *wntD* comparée à celle de mouches mutantes *wntD* non infectées. Une analyse transcriptomique a permis d'identifier à l'échelle du génome les gènes potentiellement impliqués dans la susceptibilité des mutants *wntD* à une infection létale [Gordon *et al.* 2008]. Parmi les gènes montrant une forte surexpression chez les mouches en absence de *WntD*, deux gènes nécessaires pour combattre efficacement l'infection ont été identifiés codants respectivement les protéines Edin (elevated during infection) et Eiger. Le gène *edin* code potentiellement un peptide sécrété de 115 acides aminés, spécifique des insectes et n'a pas d'homologue dans d'autres phyla. La protéine Eiger, membre de la famille TNF, joue un rôle de protection en particulier contre les pathogènes extracellulaires en activant des mécanismes cellulaires comme la phagocytose et la mélanisation [Bidla *et al.* 2007]. Cependant, une surexpression de ces mêmes gènes peut aussi entraîner une réduction de la survie des mouches face à une infection [Dionne and Schneider 2008 ; Gordon *et al.* 2008], ce qui indique que *WntD* représente un point de contrôle assurant une activation contrôlée de la réponse immunitaire face à un pathogène. Par exemple, une trop grande production de la cytokine Eiger peut entraîner un effet délétère probablement due à sa capacité à promouvoir la mort cellulaire programmée, comme le TNF [Schneider *et al.* 2007 ; Narasimamurthy *et al.* 2009].

Régulation de la voie IMD

Au niveau de l'initiation de la réponse

Alors que les PGRP non-catalytiques comme PGRP-SA, PGRP-SD, PGRP-LC ou PGRP-LE fonctionnent comme des récepteurs du peptidoglycane et activent les voies de signalisation Toll et IMD, les PGRP catalytiques régulent négativement la voie IMD en dégradant enzymatiquement le peptidoglycane microbien en fragment plus petits (Figure 11), ce qui diminue leur activité immunostimulante et ainsi réduit l'activation de la voie de signalisation [Bischoff *et al.* 2006 ; Zaidman-Remy *et al.* 2006]. Chez la drosophile, PGRP-LB, PGRP-SB1, PGRP-SB2, PGRP-SC1a/b, PGRP-SC2 sont connues pour être des amidases qui clivent le peptidoglycane [Werner *et al.* 2000 ; Kim *et al.* 2003 ; Mellroth *et al.* 2003 ; Bischoff *et al.* 2006 ; Zaidman-Remy *et al.* 2006] (Tableau 2). Des études génétiques, réalisées chez l'adulte de la drosophile, infectées par piqure avec les bactéries à Gram-négatif *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli*, par le biais d'ARN interférant induisant les pertes des fonctions *in vivo*, et de manière ubiquitaire, de PGRP-LB et PGRP-SC1/2 montrent leur importance quant à la régulation négative de la voie IMD, à la fois de manière systémique et dans l'appareil digestif des drosophiles [Bischoff *et al.* 2006 ; Zaidman-Remy *et al.* 2006].

Pirk (poor Imd response upon knock-in) est un régulateur négatif de la voie IMD qui a été identifié comme un complexe protéique interagissant avec PGRP-LC lors de deux analyses de transcriptome indépendantes [De Gregorio *et al.* 2001, Kallio *et al.* 2005]. Pirk interagit avec IMD, PGRP-LC et PGRP-LE au moins en partie *via* leur domaine d'interaction conservé RHIM (RIP homotypic interacting motif), critique pour leurs activités de signalisation [Aggarwal *et al.* 2008]. Pirk est induit lors d'une stimulation de la voie par le peptidoglycane et s'associe avec les deux récepteurs et la protéine IMD, perturbant ainsi la formation du complexe [Aggarwal *et al.* 2008 ; Kleino *et al.* 2008]. Pirk pourrait jouer un rôle dans le transport de PGRP-LC vers le lysosome pour sa dégradation. Ainsi Pirk empêche l'hyper-activation de la voie IMD en réponse à un pathogène mais il permet aussi le maintien de l'homéostasie intestinale en inhibant l'expression d'AMP induite par la présence de bactéries commensales [Lhocine *et al.* 2008].

Au niveau de la transduction du signal

Le facteur de transcription Caudal est un autre régulateur négatif de l'expression d'AMP tels que la Diptéricine et la Cecropine. Il est décrit comme agissant au niveau des cellules intestinales pour contrôler l'activation de la voie IMD par des bactéries commensales [Ryu *et al.* 2008]. En effet une perte de fonction de Caudal spécifiquement dans les cellules intestinales perturbe la balance de la population commensale intestinale, ce qui a pour conséquence une domination de certains microbes qui ne sont normalement que des populations mineures du microbiome intestinale dans des mouches sauvages.

Caspar (homologue de FAF1, Fas-associating factor 1, chez l'Homme) est aussi un régulateur négatif de la voie IMD. Caspar a été isolé au cours d'un crible de mutants de sur-expression (lignées EP) présentant une hyper-activation du système immunitaire se traduisant par une mélanisation ectopique [Kim *et al.* 2006]. La surexpression de ce gène conduit en effet à un taux de mélanisation très élevé chez la larve (15%), la puppe (14%) et l'adulte (18%). Les mouches transgéniques surexprimant Caspar spécifiquement dans le corps gras montrent une réduction de leur taux de survie suite à une infection par des bactéries à Gram-Négatif imputable à l'inhibition de la transcription du gène *Diptéricine* dépendante de la dose de Caspar ainsi qu'une inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription Relish. *A contrario*, les mutants perte de fonction de Caspar activent l'expression du gène codant la Diptéricine en l'absence d'un défi immunitaire et sont plus résistantes aux infections bactériennes. Dans des mouches infectées surexprimant Caspar, la protéine Relish cytoplasmique n'est pas clivée, et dans des mouches co-exprimant Caspar et la caspase Dredd, l'expression du gène codant la Diptéricine est complètement abolie. Ainsi, Caspar inhibe spécifiquement la voie IMD en bloquant la caspase Dredd et donc l'activation Dredd-dépendante de Relish [Kim *et al.* 2006].

Plusieurs études suggèrent que la voie IMD est régulée par la voie ubiquitine-protéasome. La perte de fonction, induite par ARN interférant, de DNR1 (Defense repressor protein), à la fois *in vitro* et *in vivo*, a pour conséquence une expression constitutive de l'AMP Diptéricine même en l'absence de défi immunitaire [Foley and O'Farrell 2004 ; Guntermann *et al.* 2009 ; Cao *et al.* 2013]. Une étude en 2009 suggère que DNR1 pourrait cibler DREDD pour sa dégradation [Guntermann *et al.* 2009].

Les deux branches de la cascade de signalisation IMD, menant à l'activation de Relish et JNK, peuvent se réguler négativement l'une et l'autre [Park *et al.* 2004]. Certains gènes dont les expressions sont induites par Relish peuvent cibler TAK1 pour sa dégradation et ainsi réduire l'activité de la voie JNK. Par exemple la ligase « Plenty of SH3 » (POSH), dont l'expression est induite par Relish, va réguler l'activité des voies JNK et IMD en aval de TAK1. La voie JNK va également inhiber la transcription induite par Relish. En effet Jra et STAT92E, homologue d'AP-1 et STAT chez les mammifères, ainsi que la protéine HMG Dsp1 forment un complexe de repression, appelé repressosome, se fixant sur le promoteur du gène de l'Attacin-A à la place de Relish, inhibant ainsi la transcription induite par ce facteur de transcription. Ce complexe va recruter la déacétylase d'histone dHDAC1 et ainsi la structure de la chromatine des régions promotrices des cibles de Relish est altérée [Kim *et al.* 2005 ; Kim *et al.* 2007].

Voies inflammatoires

Dans cette partie, je décrirai quelques situations dans lesquelles on observe une réponse inflammatoire qui se met en jeu dans un contexte aseptique ainsi que les effets d'une telle réponse, comme par exemple la sécrétion de cytokine et la production de ROS. Enfin, il me semble important de détailler les voies de signalisation majeures mises en jeu lors d'une réponse inflammatoire : les voies de signalisation JNK et JAK/STAT.

Inflammation stérile chez la drosophile

Les signaux de danger (« Damage Associated Molecular Pattern » DAMP) ne proviennent pas du pathogène. Les DAMPs représentent un groupe de molécules hétérogènes dont l'origine provient des différents compartiments cellulaires (membrane, noyau, cytosol, mitochondrie...) ou de l'espace extracellulaire (matrice extracellulaire). Leur libération est due à un dommage, un stress, l'apoptose ou la nécrose des cellules. Une fois libérés, leur reconnaissance par les récepteurs PRRs induit une activation rapide du système immunitaire, la réaction inflammatoire.

Les cellules nécrotiques

La nécrose, qui fait suite généralement à un traumatisme comme la formation d'une tumeur, un stress mécanique, chimique ou des températures extrêmes, est notamment caractérisée par la perte de l'intégrité ou la rupture de la membrane plasmique et est la source principale des molécules immunogènes DAMPs induisant une réponse inflammatoire stérile. Ces molécules peuvent être modifiées par les ROS contenus dans l'environnement des cellules stressées. Chez les mammifères HMGB1, une protéine non-histone pouvant lier l'ADN, a été identifiée comme DAMP [Kono *et al.* 2014 ; Lugin *et al.* 2014]. La protéine HMGB1 partiellement oxydée par les ROS est libérée des cellules nécrotiques et se lie aux médiateurs extracellulaires de l'inflammation tels que l'ADN simple brin ou le LPS et induit l'activation des récepteurs de type Toll [Tsong *et al.* 2014]. Un tel mécanisme n'a pas encore été étudié chez la drosophile mais des expériences non publiées par Z. Shaukat, D. Liu et S. Gregory (Australie) montrent que la perte de la protéine HMG de drosophile (Dorsal switch protein 1, Dsp1) réduit l'inflammation stérile. Le relargage d'ADN par les cellules nécrotiques peut aussi contribuer chez la drosophile à une réponse inflammatoire, puisque des mouches dont la fonction de la DNaseII est bloquée montrent une réponse humorale [Mukae *et al.* 2002] présentant des similarités avec la signalisation observée chez les vertébrés [Liu *et al.* 2012]. En 2002, Mukae *et al.* se sont intéressés à l'activation du système immunitaire inné de la drosophile par les molécules d'ADN endogènes échappant à la dégradation lors de l'apoptose [Mukae *et al.* 2002]. En effet, ils ont générés des drosophiles mutantes nulles pour le gène dICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) par insertion d'élément-P et ont également étudié un mutant perte de fonction pour la DNaseII. Chez les vertébrés, ICAD est un inhibiteur de la DNase CAD (caspase-activated DNase, activée lors de la mort cellulaire) [Liu *et al.* 1997 ; Enari *et al.* 1998]. Dans les cellules en prolifération, ICAD forment un complexe avec CAD, empêchant ainsi son action. A l'induction de la mort cellulaire, les caspases (et en particulier la caspase-3) vont cliver ICAD, permettant ainsi la libération de CAD qui dégrade l'ADN chromosomique [Sakahira *et al.* 1998]. Chez la drosophile, dCAD et dICAD, homologues de CAD et ICAD respectivement, ont été impliqués dans la fragmentation de l'ADN dans la lignée de cellules neurales BG-2 [Mukae *et al.* 2000 ; Yokoyama *et al.* 2000]. Chez des mutants nuls pour dICAD, qui présentent une expression constitutive des AMP Diptericine et Attacine (marques d'un état inflammatoire) [Mukae *et al.* 2002], la fragmentation de l'ADN observée à l'activation du mécanisme de mort cellulaire

[Nagano *et al.* 1998] est abolie. McIlroy *et al.*, ayant observé dans un modèle murin que cette fragmentation était également observée dans les cellules apoptotiques à l'intérieur des macrophages, ont proposé que l'ADN des cellules apoptotiques puisse aussi être clivé par la DNase lysosomale DNaseII après la phagocytose par les macrophages des cellules apoptotiques [McIlroy *et al.* 2000]. De manière intéressante, les mouches mutantes perte de fonction pour la DNaseII montrent une fragmentation de l'ADN plus prononcée que des mouches sauvages.

Une réponse rapide et importante de l'organisme suite à une plaie consiste au recrutement de cellules inflammatoires attirées par des signaux de danger libérés par le tissu endommagé. Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) jouent un rôle majeur dans cette réponse chez les vertébrés (Figure 12) mais aussi chez la Drosophile. Il a été montré chez cet insecte que l'espèce réactive de l'oxygène de type peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), constitue un signal immédiat transitoire émit par les cellules au site de blessure qui entraîne le recrutement rapide des hémocytes à ce niveau [Yang *et al.* 2013 ; Moreira *et al.* 2010 ; Razell *et al.* 2013].

La nécrose cellulaire peut avoir un effet sur les cellules adjacentes. Il a été observé, par exemple, chez des patients ayant subi une ischémie cérébrale que les cellules (neurones) au cœur de la baisse de l'oxygénation nécrosent mais aussi que les cellules périphériques à cette zone dysfonctionnent progressivement. Ce phénomène pose la question de savoir comment les cellules voisines répondent à la présence d'un foyer de cellules nécrotiques, comment la mort des cellules pourrait se propager et quels sont les signaux qui conduiraient à cette propagation. Un travail récent chez la drosophile s'est intéressé à ces questions en analysant les effets de l'induction de la nécrose d'une population de neurones dans l'œil en développement grâce au système UAS GAL4 (Figure 6). Cette étude montre que la mort de ces cellules s'étend aux cellules adjacentes. En particulier, la mort de ces cellules implique les ROS ainsi que l'homologue du TNF α (Eiger) libérés par les cellules nécrotiques neuronales qui induit l'activation de la voie JNK dans les cellules environnantes [Yang *et al.* 2013]. L'activation de cette voie de signalisation va conduire à l'induction des mécanismes d'apoptose, de recrutement des hémocytes et de cicatrisation de la blessure [Yang *et al.* 2013 ; Wu *et al.* 2009].

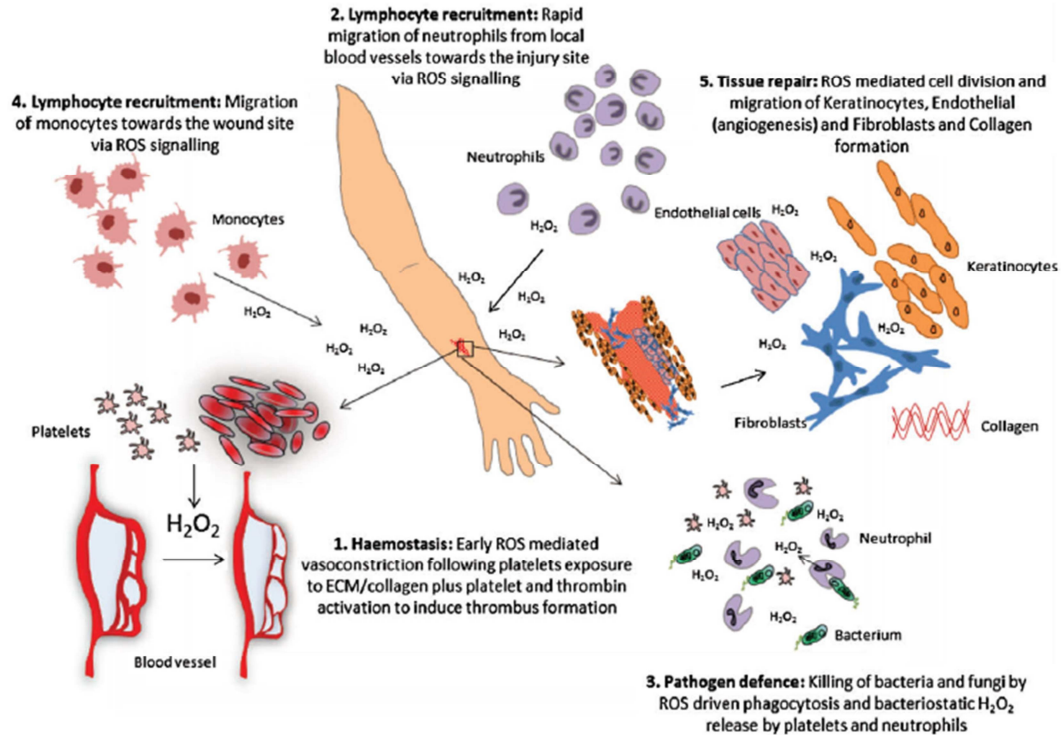


Figure 12: Implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le traitement d'une blessure chez les mammifères. Schéma représentant l'apport des ROS lors d'une réponse inflammatoire aiguë. **1)** Les ROS sont des molécules importantes pendant les phases précoces de de la réponse à la blessure. Elles induisent une vasoconstriction et sont des signaux au niveau local favorisant la formation d'un caillot. **2)** Les ROS, au site de blessure, sont des chémo-attractants attirant les neutrophiles des vaisseaux sanguins locaux vers le site de blessure. Ces leucocytes sont attirés au site de blessure en prévision d'une possible infection. **3)** Les neutrophiles sécrètent des ROS pour retarder la croissance bactérienne et renforcer le signal de réponse à la blessure. **4)** Les ROS constitue le signal qui attire les monocytes qui vont migrer au site de blessure pour palier à une possible infection. **5)** Le relargage de ROS au site de blessure stimule la division des cellules endothéliales et leurs migrations pour la reconstruction des vaisseaux sanguins lésés, la division des fibroblastes (cellules sécrétant la matrice extracellulaire), la synthèse de collagène ainsi que la prolifération des kératinocytes et leur migration. Adapté de Dunnill *et al.* 2015.

Les « undead cells » ou cellules morts-vivantes

Les cellules dites « mort-vivantes », comme les cellules qui échappent à l'apoptose en raison de mutations des caspases [Obata *et al.* 2014], sont connues pour activer la réponse immunitaire innée en l'absence de pathogène [Ming *et al.* 2014 ; El Chamy *et al.* 2008]. Le modèle drosophile est utilisé pour comprendre comment l'inflammation stérile déclenchée par les facteurs endogènes DAMPS contribue à la pathogenèse des maladies inflammatoires aiguës ou chronique. Obata et al ont mis en place un modèle drosophile de réponse inflammatoire induite par la nécrose qui implique un déséquilibre métabolique [Obata et al.

2014]. Les cellules épidermiques de l'aile dans lesquelles la signalisation apoptotique est déficiente (mutants hypomorphes pour Dark, l'homologue de l'activateur Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) ou transgéniques permettant une inhibition ciblée de Dark dans ces cellules par RNA interférant grâce au système UAS-Gal4), sont des cellules nécrotiques qui induisent spontanément une réponse immunitaire. L'analyse du profil métabolique des mutants Dark combinée à une étude génétique permet de montrer que la réponse systémique dirigée par la nécrose conduit dans le corps gras à l'activation de l'expression d'AMPS mais aussi à l'hyper-activation du facteur de transcription dFOXO ce qui a deux conséquences : - une augmentation de la lipolyse caractérisée par la diminution des taux triglycérides source de la production d'énergie (ATP) suggérant un phénotype de « gaspillage énergétique » et - l'augmentation de l'expression de l'homologue chez la drosophile de la Glycine N-méthyltransférase (Gnmt) qui conduit à la réduction du taux de S-adenosyl-méthionine (SAM) qui contrebalancerait la perte d'énergie due à la lipolyse et donc l'épuisement de l'organisme. Si ce mécanisme est conservé chez les mammifères, il sera intéressant d'étudier son implication dans des conditions physiologiques et pathologiques.

La réponse immunitaire induite par la nécrose est médiée par la voie Toll. Le mécanisme d'activation de la cascade protéolytique conduisant à la production de la cytokine Spätzle active est mal connu. Persephone, dans l'hémolymphe, agit comme un détecteur qui informe les insectes sur la présence de signaux de stress, de danger ou de pathogènes [Gottar *et al.* 2006]. Les éléments déclencheurs de Persephone dans le cas d'une inflammation stérile sont inconnus mais plusieurs études permettent d'émettre l'hypothèse que la libération de matériel nécrotique (comme par exemple des protéases intracellulaires) peut déclencher l'activation de Persephone et la cascade de clivage entraînant une réponse immunitaire systémique [Buchon *et al.* 2014; Krautz *et al.* 2014; Ferrandon *et al.* 2007; Ming *et al.* 2014]. Cette activation systémique peut être restreinte *via* les protéines de la famille des Serpines comme la protéine Necrotic, qui est exprimée de manière ubiquitaire et aide à l'établissement d'un gradient de signaux moléculaires au site de blessure en réduisant l'activité protéolytique globale dans tout l'organisme. Cette localisation du signal aide au recrutement des hémocytes [Bidla *et al.* 2009].

Les blessures

La réparation des blessures chez la drosophile comme chez les mammifères est nécessaire pour leur survie et implique une réponse rapide afin de restaurer la continuité tissulaire permettant de protéger l'organisme de l'environnement extérieur et de prévenir les infections. Dans un environnement stérile, une blessure, qui implique à la fois des cellules nécrotiques et des cellules stressées, induit une activation de la réponse immunitaire similaire à celle décrite plus haut. L'hypothèse qu'une blessure aseptique chez la drosophile stimule la réponse au pathogène comme mesure de protection contre une possible infection provient d'études visant à mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la cicatrisation des blessures et l'inflammation comme l'analyse des profils transcriptomiques d'embryons sauvages ou déficients en hémocytes (mutants serpent) [Stramer *et al.* 2008], de cribles génétiques sur des embryons ou des larves blessées ou non [Iesch *et al.* 2010 ; Campos *et al.* 2010] ou encore de cribles de facteurs de coagulation [Hyrsl *et al.* 2011]. Ces études ont permis d'identifier des gènes activés par la blessure dans les hémocytes codant par exemple la phospholipase sécrétée A2, conservée chez les mammifères, impliquée dans la biosynthèse des eicosanoïdes et régulateur du processus de coagulation, et qui par ailleurs, a un effet protecteur dans un modèle d'infection impliquant une blessure [Hyrsl *et al.* 2011], la Drosomycine, la protéine GADD45 (Growth arrest and DNA damage-inducible 45) associée à la réponse inflammatoire induite par la blessure, ainsi que les acteurs de la voie JNK. Cependant la réponse induite est moins prononcée qu'en cas de réelle infection [Clark *et al.* 2011].

Dans le cas d'une blessure stérile, la libération des molécules immunogéniques comme les DAMP au site de blessure résulte en l'activation et en la différenciation des précurseurs d'hémocytes en lamellocytes [Wang *et al.* 2014; Krautz *et al.* 2014 ; Gottar *et al.* 2006 ; Marcus *et al.* 2005]. Les lamellocytes sont impliqués dans l'encapsulation des tissus cibles et leur mélanisation par l'activation de la cascade de phénoloxydase. La rupture de la membrane basale des cellules épithéliales entraîne l'activation de la réponse immunitaire au site de blessure; le même phénomène de recrutement et d'augmentation du nombre d'hémocytes vers le site de tumeurs néoplasique a aussi été observé [Pastor-Pareja *et al.* 2008 ; Babcock *et al.* 2008 ; Rizki *et al.* 1980]. Un modèle auto-immun de formation de

masse mélanotiques a été réalisé chez la drosophile en utilisant une inhibition médiée par RNAi de certains composants de la membrane basale et en particulier de la laminine. Ce modèle a permis de suggérer que la laminine est cruciale dans l'assemblage de la membrane basale et le maintien de l'intégrité des cellules épithéliales et qu'elle constitue un élément majeur de la tolérance immunitaire au soi (son inhibition conduit à une encapsulation des tissus par les lamellocytes) probablement en agissant comme un ligand inhibiteur pour les hémocytes [Kim *et al.* 2014 ; Yurchenco 2011].

Effets de la réponse inflammatoire

L'inflammation chez la drosophile a pour conséquence la production d'AMP et le recrutement d'hémocytes au site d'inflammation [Wang *et al.* 2014 ; Krautz *et al.* 2014]. Ces AMPs ne sont pas décrits comme ayant un impact fort sur l'organisme en absence de pathogène. Cependant la sur-expression de divers AMP directement dans les neurones d'une mouche peut conduire à des lésions du tissu neural observables tardivement dans leur vie adulte [Cao *et al.* 2013] et induire une réaction auto-immune comme chez les vertébrés dans le cas du peptide antimicrobien LL37 sur-exprimé dans les cellules de la peau endommagée ou affectées par le psoriasis mais aussi dans diverses cellules (gastro-intestinales, pulmonaire, membranes synoviale) développant une inflammation [Gilliet and Lande 2008].

Le recrutement des hémocytes, quant à lui, va avoir un impact conséquent pour le tissu impliqué ainsi que pour l'organisme entier.

Une population d'hémocytes circule dans l'hémolymphe et est au contact de la surface basale de la plupart des organes et tissus. Comme nous l'avons vu plus haut, les signaux libérés par les tissus endommagés conduisent au recrutement des hémocytes au site de blessure. Grâce à une lignée transgénique de drosophile exprimant une protéine fluorescente spécifiquement dans les hémocytes, il a été possible d'étudier précisément le comportement des cellules circulant dans l'hémolymphe suite à une blessure chez la larve. Autour du site d'inflammation, les hémocytes liés au tissu ne changent pas de localisation et sont inactifs alors que les hémocytes circulants sont rapidement recrutés par adhésion au

site de blessure, sont ensuite distribués à travers la plaie, montrent une forte activité de phagocytose puis sont relargués dans la circulation par l'épiderme réparé. Le rôle de sentinelle des dommages tissulaires joué par les cellules circulantes chez la drosophile ainsi que leur capture par adhésion sont des mécanismes conservés chez la drosophile et les mammifères [Babcock *et al.* 2008]. Lors d'une blessure stérile, les plasmotocytes (équivalant des macrophages chez les mammifères) et les cellules à cristaux se rassemblent et sécrètent des facteurs de coagulation et des molécules de signalisation [Krautz *et al.* 2014]. Parmi ces signaux, et de manière similaire aux vertébrés lors d'une inflammation stérile, sont retrouvés le ligand Eiger, homologue du TNF α chez les mammifères ainsi que les cytokines Unpaired-3 (Upd-3) et Spätzle (Spz) [Kono *et al.* 2010].

Les cytokines

Chez la drosophile, la production de Spz par les hémocytes semble être impliquée dans la mise en place d'une réponse immunitaire systémique plutôt que locale puisque, par exemple, l'activation du récepteur de la cytokine Spz, Toll, spécifiquement dans les hémocytes n'améliore pas la réponse immunitaire [Schmid *et al.* 2014]. L'effet de l'activation de Spz dans les hémocytes résulte en fait plutôt en l'activation de longue portée de l'expression des AMPs dans le corps gras [Parisi *et al.* 2014 ; Lindsay and Wasserman 2014 ; Kounatidis and Ligoxygakis 2012].

Récemment, une analyse systématique de la réponse de divers tissus, dont les hémocytes et le corps gras, en réponse à la présence d'une tumeur en développement a permis de montrer que le ligand Spz produit par les hémocytes active dans le corps gras la voie Toll nécessaire afin d'activer la mort cellulaire dans le tissu cible par l'induction en retour de l'homologue de drosophile du TNF α , Eiger, produit par les hémocytes [Cordero *et al.* 2010, Parisi *et al.* 2014]. En effet, chez la larve, l'inhibition médiée par ARNi, ou la sur-expression d'un transgène codant Eiger spécifiquement dans les hémocytes d'un individu mutant présentant des tumeurs grâce au système UAS-GAL4, permet d'observer respectivement une augmentation de la taille de la tumeur sans signe d'apoptose et une

diminution de la taille de la tumeur avec une augmentation significative de la mort des cellules tumorales [Parisi *et al.* 2014].

La production de la cytokine Spz est très finement contrôlée. Lors d'une infection, le ligand Spz qui est synthétisé à l'état de pro-protéine, peut être clivé par de nombreuses protéases extracellulaires produites par des bactéries ou activées par des molécules bactériennes [Krautz *et al.* 2014]. Dans le cas d'une inflammation stérile, c'est probablement la protéase Persephone qui est requise pour l'activation de Spz. Cette idée provient notamment de l'analyse de larves mutantes pour l'homologue de la caspase-9, Dronc, déficientes dans le processus d'apoptose, qui a permis de montrer que leur hémolymphe contient la forme active du ligand du récepteur Toll et d'impliquer la protéase Persephone, circulante dans l'hémolymphe, dans l'activation protéolytique de Spz conduisant à une réponse immunitaire systémique *via* l'activation de la voie Toll dans le corps gras [Ming *et al.* 2014 ; El Chamy *et al.* 2008]. La voie moléculaire par laquelle le récepteur Toll active la réponse immunitaire humorale a été analysée en détail [Buchon *et al.* 2014 ; Krautz *et al.* 2014 ; Ferrandon *et al.* 2007]. Cependant les produits de cette voie, les AMPs mis à part, en réponse à des DAMP sont encore relativement inconnus.

Les hémocytes peuvent aussi sécréter la cytokine Unpaired-3 (Upd-3, homologue de l'interleukine IL-6 chez les mammifères) en réponse à une production de cette même cytokine activée par une blessure ou la présence d'une tumeur [Pastor-Pareja *et al.* 2008]. Les tissus endommagés activent la voie JNK qui induit la transcription des cytokines Upd, Upd-2 et Upd-3 capables d'activer la voie de signalisation JAK/STAT dans les hémocytes recrutés au site de blessure mais aussi dans les cellules du corps gras. L'activation de cette voie de signalisation augmente la sécrétion des cytokines Unpaired par les hémocytes, mais induit aussi la prolifération de ces hémocytes et la différenciation des lamellocytes [Myllymäki and Rämet 2014].

La signalisation TNF

Alors que Spz et Unpaired ont des effets systémiques sur le nombre des hémocytes, la première molécule sécrétée par ces cellules lors d'une inflammation stérile est

Eiger/dTNF α [Bangi 2013 ; Igaki and Miura 2014]. Cette cytokine est sécrétée par les hémocytes recrutés aux niveaux des cellules endommagées [Parisi *et al.* 2014] mais probablement aussi par les autres hémocytes [Pastor-Pareja *et al.* 2013 ; Cordero *et al.* 2010]. La signalisation induite par la fixation d'Eiger sur son récepteur Wengen, homologue du TNFR, a 2 effets : l'activation de la voie de signalisation JNK et la mort cellulaire [Igaki *et al.* 2014]. Il a été en effet montré qu'une forte et persistante expression de Eiger dans les disques imaginaux de l'œil conduit à la mort des cellules et à un œil de petite taille chez l'adulte. La mort cellulaire induite par Eiger est liée à l'activation de la voie JNK, puisque ce processus est supprimé par l'inhibition des acteurs de cette voie. Cette activation conduit à une augmentation de la transcription des gènes pro-apoptotiques *hid* et *reaper* [Moreno *et al.* 2002]. Récemment, en utilisant aussi l'œil de la drosophile comme modèle, il a été montré que la MAPK3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) Wallenda, est suffisante pour activer la petite GTPase Rac1 et induire la mort cellulaire en induisant la voie JNK. De plus, Wallenda est requise pour l'activation ectopique de la mort cellulaire induite par Eiger. Cette kinase ne semble pas toutefois intervenir dans le processus de fermeture dorsale chez l'embryon, modèle développemental de cicatrisation [Ma *et al.* 2015]. Wallenda jouerait cependant un rôle de détecteur de blessure dans le tissu nerveux : la libération d'AMP cyclique par des neurones lésés active cette kinase et permet leur régénération par un mécanisme moléculaire conservé chez les mammifères [Hao *et al.* 2016]. La mort cellulaire induite par Eiger dépend de la voie JNK, cependant Eiger peut aussi induire l'expression des gènes pro-apoptotiques *hid* et *reaper* par une voie indépendante de la voie JNK et dépendante de l'homologue de la caspase 9, DRONC (Death regulator Nedd2-like caspase), mettant en jeu l'homologue drosophile de TRIP (TRAF interacting protein), Nopo, E3 ubiquitin ligase codée par le gène *no poles* [Ma *et al.* 2012]. Ainsi, chez la drosophile la mort cellulaire apparaît comme une conséquence de la réponse inflammatoire.

Les hémocytes, premiers détecteurs de signaux de danger ou de la présence de pathogène, sécrètent la forme active de la cytokine Spz et induisent ainsi une activation systémique de la voie Toll, mais également les cytokines Unpaired qui vont conduire à la prolifération de ces hémocytes. Cependant il est important de savoir comment la réponse se focalise dans un premier temps dans la région endommagée ou infectée [Pastor-Pareja *et al.* 2013]. Le recrutement des hémocytes et leur rétention au site de blessure semblent être des

processus importants pour localiser la réponse. Le relargage de la cytokine Eiger induit de la mort cellulaire et l'activation de la voie JNK ce qui entraîne l'expression de protéases comme les metalloprotéinases de la matrice (MMP) qui dégradent les protéines de la membrane basale pendant la cicatrisation d'une blessure. Les hémocytes en réagissant à des signaux de blessure génèrent un dommage local qui pourrait renforcer leur localisation.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Le rôle des ROS lors d'une inflammation stérile est important mais encore mal défini. Plusieurs de ces molécules sont impliquées dans les réponses antibactériennes [Buchon *et al.* 2014 ; Dekanty *et al.* 2012]. Par exemple suite à une infection, les cellules à cristaux chez la larve activent le processus de mélanisation qui génère des ROS au site d'infection et induit la coagulation et dans les cellules intestinales, la synthèse des ROS (par les NAPDH oxydases) jouent un rôle dans le combat contre l'infection. Dans ce contexte, les ROS vont endommager les pathogènes mais aussi stimuler les hémocytes pour induire une réponse systémique [Wu *et al.* 2012].

Dans le cas d'une inflammation stérile, l'expression des ROS peut être induite par la voie de signalisation du TNF α et contribuer à la mort cellulaire. Kanda *et al.* montrent que l'induction de la surexpression de Eiger dans les disques imaginaux de l'œil conduit à un stress oxydatif et, chez l'adulte, à une taille d'œil réduite. En effet, en induisant cette surexpression dans des mouches porteuses d'un transgène permettant l'expression d'une protéine rapporteur fluorescente sous le contrôle du promoteur du gène de la Glutathione S transferase D1, inductible par les ROS, ils observent une augmentation de l'expression du rapporteur [Kanda *et al.* 2011]. Les ROS, qui peuvent diffuser à travers les cellules et agir comme seconds messagers, peuvent moduler l'activation la voie JNK [Nam *et al.* 2012 ; Ohsawa *et al.* 2012]. Par exemple, une étude génétique récente a montré que les ROS sont impliqués dans la transmission du signal d'alarme produit localement par une blessure à l'ensemble de l'organisme. Chez l'adulte, au site de blessure, la protéase Hyan circulant dans l'hémolymphe est capable de sentir la blessure et d'induire l'activation de l'enzyme phenoxidase responsable de la formation de la mélanine. Le processus local de

mélanisation génère des ROS qui diffusent à travers tout l'organisme et activent dans les cellules nerveuses un processus cytoprotecteur dépendant de la voie JNK, processus de réponse systémique protégeant globalement l'hôte [Nam *et al.* 2012]. De manière intéressante, il a été montré dans les embryons de la drosophile et du zebrafish que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par les tissus endommagés (comme dans le cas d'une blessure par piqure aseptique) est nécessaire au recrutement des hémocytes [Razzell *et al.* 2013 ; Niethammer *et al.* 2009].

L'utilisation d'une lignée transgénique permettant l'expression spécifique dans l'épiderme des embryons, grâce au système UAS GAL4, d'un transgène rapporteur du calcium intracellulaire a permis de montrer que la réponse inflammatoire est activée par la production d'un flash de calcium par les cellules épithéliales au site de blessure qui se propage aux cellules adjacentes *via* des protéines de jonctions cellulaires appelées Innexin-2 (Inx2). L'effecteur de cette vague de calcium est l'enzyme NADPH oxydase DUOX (Dual Oxydase) qui a la capacité de transporter des électrons à travers la membrane plasmique et produit de l'anion superoxyde O₂⁻, précurseur des autres formes réactives de l'oxygène. L'activation de DUOX conduit ainsi à la synthèse de H₂O₂ [Razell *et al.* 2013].

Les voies JNK et JAK/STAT

Traumatismes et infections entraînent la production de motifs moléculaires associés aux dommages (Damage Associated Molecular Pattern, DAMPs) qui induisent la sécrétion de cytokines permettant d'activer l'inflammation au site de blessure pour coordonner la production d'AMP et le recrutement de cellules nécessaires à la réparation. La voie Jun N-terminal kinase (JNK), une cascade de protéines kinases activée par le stress et évolutivement conservée chez les métazoaires est notamment mise en jeu. Un grand nombre d'agressions endogènes et environnementales (UV, ROS, ADN endommagé, chaleur, antigènes microbiens, cytokines inflammatoires) sont à l'origine du processus du stress. Lors d'une blessure, la cytokine Unpaired 3 (Upd3) est sécrétée par les cellules au site de blessure suite à l'activation de la voie JNK [Pastor-Pareja *et al.* 2008]. La voie JNK peut être aussi activée au site de blessure par la voie IMD et promouvoir l'apoptose et la prolifération

cellulaire [Tsuda *et al.* 2005] mais d'autres possibilités d'activation de cette voie semblent exister [Biteau *et al.* 2010]. C'est le cas du récepteur Grindelwald (Grnd) pouvant lier Eiger/dTNF α [Anderson *et al.* 2015]. Au site de blessure, le recrutement des hémocytes est accru par l'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire JAK/STAT médiée par la cytokine Upd3 [Stokes *et al.* 2015]. Ainsi, les hémocytes et le corps gras par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines induisent une boucle de rétroaction positive de l'inflammation. Le système circulatoire chez la drosophile étant un système ouvert où chaque organe est directement immergé dans l'hémolymphe, une inflammation locale devient donc très rapidement systémique [Pastor Pareja *et al.* 2008].

Voie JNK

Chez la drosophile, l'activation de la voie JNK peut se mettre en place suite à la reconnaissance de la cytokine Eiger/dTNF α à son récepteur Wengen homologue du récepteur au TNF chez les mammifères [Igaki *et al.* 2002 ; Kanda *et al.* 2002 ; Kauppila *et al.* 2003]. L'activation de la voie JNK permet d'induire les processus d'apoptose, de la cicatrisation des blessures, de morphogénèse et de l'immunité [Moreno *et al.* 2002 ; Sluss *et al.* 1996 ; Bidla *et al.* 2007]. En aval de la fixation de Eiger sur son récepteur Wengen, une ou plusieurs JNK kinases kinases (JNKKK) sont activées par des mécanismes encore mal connus. La JNKKK Tak1 active deux JNKK, Hemipterous (Hep ; homologue de MKK7 chez les mammifères) et Mkk4 (homologue de Mkk4 chez les mammifères) [Chen *et al.* 2002]. Ces dernières activent la kinase Basket (Bsk ; homologue de JNK chez les mammifères) [Han *et al.* 1998 ; Chen *et al.* 2002 ; Baril *et al.* 2006] qui phosphoryle et active les facteurs de transcription Jra (Jun-related antigen » ; homologue de Jun chez les mammifères) et Kay (Kayak ; homologue de Fos chez les mammifères) [Kockel *et al.* 2001] qui agissent comme hétérodimère (Jra/Kay; AP1) (Figure 13). La voie de signalisation JNK régule l'expression de divers gènes impliqués dans la réponse immunitaire induite après une blessure septique [Boutros *et al.* 2002]. Elle permet la régulation de l'expression de gènes codant des AMPs, notamment ceux de la voie IMD [Delaney *et al.* 2006 ; Kallio *et al.* 2005]. En effet, la perte de fonction de membres de la voie JNK, tels que le facteur de transcription Kayak (Kay) ou la JNKK Hemipterous (Hep), dans les cellules S2 a pour conséquence une baisse de l'activité

luciférase induite par l'expression du gène codant l'AMP Attacine suite à une infection par la bactérie à Gram-négatif *E.coli* [Kallio *et al.* 2005]. Cette régulation est indépendante du facteur de transcription Relish. Delaney *et al.* montrent que la perte de fonction, chez la larve et l'adulte, de la TGF- β activated kinase 1 (dTak1), qui est à l'interface entre les voies JNK et IMD [Silverman *et al.* 2003], a pour conséquence une inhibition de l'expression des gènes codants les AMPs Attacine, Cecropine et Diptéricine suite à une infection par *E.coli* [Delaney *et al.* 2006]. Cependant, ces mutants montrent une activation du facteur de transcription Relish comparable à celle observée dans un contexte sauvage, indiquant que l'inhibition de l'expression des AMPs ne provient pas d'un défaut de clivage, de translocation dans le noyau ou de fixation aux promoteurs des gènes cibles de ce facteur [Delaney *et al.* 2006]. De manière intéressante, l'expression d'une forme active de la JNKK Hep, qui est en aval de dTak1 dans la voie de signalisation JNK, rétablit l'expression du gène codant l'AMP Diptéricine dans un contexte de perte de fonction pour dTak1, et ce uniquement en réponse à une infection [Delaney *et al.* 2006]. Par ailleurs, la surexpression de la phosphatase Puckered (inhibiteur de la voie de signalisation JNK) dans les cellules du corps gras de drosophiles adultes résulte en la réduction de l'expression de l'AMP Diptéricine, mais également des AMPs Drosomycine et Metchnikowin, indiquant que cette régulation de l'expression des AMPs s'étend au-delà de ceux de la voie IMD [Delaney *et al.* 2006].

Il a été démontré que l'activation de la voie JNK, en réponse à une infection, peut être bénéfique ou délétère. En effet, des drosophiles mutantes pour Eiger sont plus susceptibles aux infections, par des pathogènes tels que *P. gingivalis* et *S. aureus* [Igboin *et al.* 2011 ; Schneider *et al.* 2007], que des drosophiles sauvages. Cependant ces mutantes sont aussi plus résistantes à certains pathogènes intracellulaire tel que *S. typhimurium* [Schneider *et al.* 2007 ; Brandt *et al.* 2004].

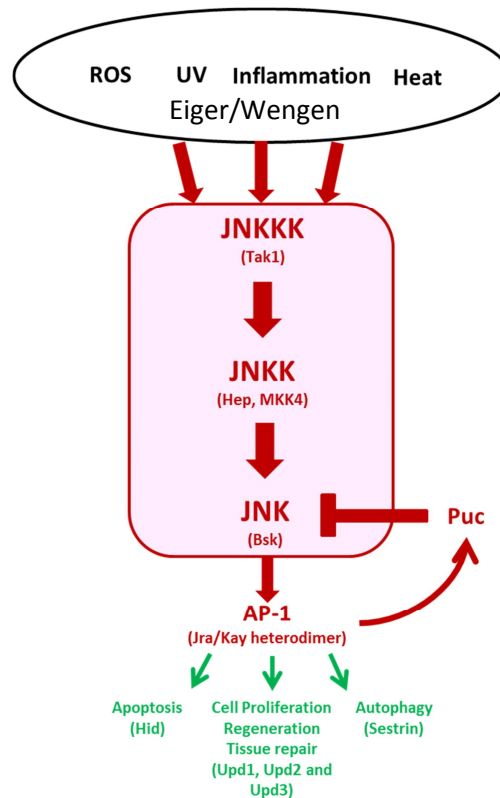


Figure 13 : La voie de signalisation JNK. La voie de signalisation JNK est activée suite à un stress de l'organisme, induit par exemple par une blessure engendrant une inflammation. Voir texte pour la description de la voie. Adapté de Biteau *et al.* 2011.

La régulation de la voie JNK

Plusieurs régulateurs négatifs de la voie de signalisation JNK ont été identifiés. Ainsi on retrouve Alphabet (Alph), une phosphatase antagonisant l'action de phosphorylation de Tak1 [Baril *et al.* 2009]. La protéine kinase Pva et l'enzyme Peroxiredoxin vont antagoniser la phosphorylation de JNK par Tak1 [Bond *et al.* 2009 ; Radyuk *et al.* 2010]. La phosphatase Puckered (Puc ; homologue de DUSP10 chez les mammifères) antagonise l'activité kinase de JNK [Martin-Blanco *et al.* 1998]. Enfin, une régulation négative de la voie JNK implique la dégradation par le protéasome de la kinase Tak-1 médiée par Relish probablement indirectement. Les cibles de Relish seraient impliquées dans l'augmentation de la susceptibilité à la dégradation par le protéasome ou encore dans l'antagonisation des facteurs responsables de la stabilisation de la kinase Tak-1 [Park *et al.* 2004] (Figure 13).

Voie JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription)

Chez les mammifères, la voie de signalisation JAK/STAT a été associée à plusieurs aspects du système immunitaire inné, incluant le contrôle de la réponse inflammatoire, la cicatrisation d'une blessure et l'activation des neutrophiles et des macrophages. Cette voie est très conservée au cours de l'évolution et fut d'abord identifiée chez les vertébrés comme voie de transduction activée par les cytokines. Il m'a semblé important de faire un rappel quant à son activation et sa régulation lors d'un défi inflammatoire ou immunitaire chez la drosophile.

Description de la voie JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT (JANus Kinase protein and the Signal Transducer and Activator of Transcription, Figure 14) a essentiellement les mêmes constituants que chez les mammifères, avec cependant moins de redondance.

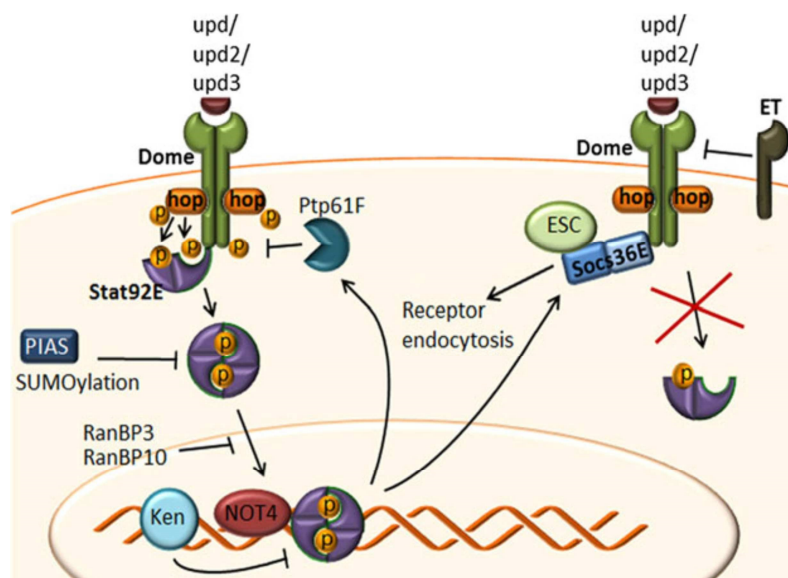


Figure 14 : La voie JAK/STAT chez la drosophile. Les cytokines Unpaired (Upd), Upd2 et Upd3 produites suite à l'activation de la voie JNK lient le récepteur pré-dimérisé Domeless (Dome). Cette reconnaissance induit l'autophosphorylation des Janus kinases Hopscotch (Hop) et la phosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur Dome, créant ainsi un site de recrutement des protéines Stat92E. Les protéines Stat92E phosphorylées dimérisent et transloquent dans le noyau. Associé à la protéine NOT4 du complexe de transcription CCR4-NOT, la liaison de Stat92E à sa séquence d'ADN palindromique est stabilisée et la transcription des gènes cibles est activée. L'activation de la voie de signalisation JAK/STAT est régulée à différents niveaux (voir texte). Socs36E (suppressor of cytokine signalling 36); ECS (E3 ubiquitin ligase elongin-cullin-SOCS); Ptp61F (tyrosine phosphatase Ptp61F); ET (Eye Transformer); RanBP3 (Ras-like guanine nucleotide binding 3); RanBP10 (Ras-like guanine nucleotide binding 10); PIAS (Protein inhibitor of activated STATs). Adapté de Myllymäki and Rämetsä 2014.

Chez la drosophile, la voie de signalisation JAK/STAT contribue directement aux réponses au stress et à l'infection en activant l'expression de certains gènes, tels que ceux des protéines de la famille Turandot (Tot) [Agaisse *et al.* 2004 ; Boutros *et al.* 2002]. Les ligands connus pour activer cette voie sont les cytokines Unpaired (Upd), Upd2 et Upd3. Ces trois cytokines sont produites localement en réponse par exemple à une blessure causant des dommages tissulaires. Elles activent la voie en se fixant sur le récepteur membranaire Domeless (Dome ; équivalent de la protéine GP130 chez les mammifères), qui présente des similarités de fonction et de séquence avec les récepteurs aux cytokines de classe I, comme par exemple celui de l'interleukine 6 (IL6) [Brown *et al.* 2001 ; Chen *et al.* 2002]. Le récepteur pré-dimérisé est activé suite à la fixation du ligand et induit une cascade de phosphorylation impliquant les Janus kinases Hopscotch (Hop ; homologue de JAK2 chez les mammifères), constitutivement associées avec la partie cytoplasmique du récepteur et la partie intracytoplasmique de Dome qui va permettre le recrutement des protéines cytoplasmiques Stat92E (homologue de STAT5 chez les mammifères), leur phosphorylation, leur dimérisation et leur translocation dans le noyau où elles peuvent alors jouer le rôle d'activateur de la transcription de leurs gènes cibles [Kiu *et al.* 2012] (Figure 14).

La régulation de la voie JAK/STAT

La régulation de la voie JAK/STAT est en partie sous le contrôle du récepteur Eye transformer (ET). Makki *et al.* ont montré *in vivo*, dans les processus d'hématopoïèse chez la larve de la drosophile, en utilisant un allèle perte de fonction généré par recombinaison homologue, que ET forme un hétérodimère avec Dome et antagonise ainsi son activité. Leur analyse a montré qu'une des premières réponses immunitaires à l'infection par des œufs de guêpes était une forte diminution du niveau des ARNm de cytokines, suivie d'une augmentation du ratio ET/Dome. Ceci aboutit à l'inhibition complète de la voie JAK/STAT par ET [Makki *et al.* 2010 ; Kallio *et al.* 2010].

La protéine Socs36E (suppressor of cytokine signalling 36E ; homologue de SOCS5 chez les mammifères) participe aussi à la régulation de la voie. L'expression de socs36E est induite par la voie JAK/STAT [Golic *et al.* 1997 ; Groth *et al.* 2004]. Par un mécanisme mettant en jeu le complexe E3 ubiquitin ligase elongin-cullin-SOCS (ECS), Socs36E induit une baisse de la quantité du récepteur Dome présent par dégradation lysosomale [Venken *et al.* 2006 ; Fischer *et al.* 1988]. Socs36E peut aussi réguler la voie JAK/STAT *via* l'inhibition de la phosphorylation de Dome par Hop [Venken *et al.* 2006].

Deux cribles différents par ARNi visant à identifier systématiquement à l'échelle du génome les régulateurs de la voie JAK/STAT [Baeg *et al.* 2005 ; Müller *et al.* 2005] ont permis de mettre en évidence la protéine tyrosine phosphatase Ptp61F, cible transcriptionnelle de la voie JAK/STAT. Cette phosphatase régule négativement la voie de signalisation en ciblant les Janus Kinases Hop.

L'activité de Stat92E, sa localisation ainsi que sa capacité à fixer l'ADN sont aussi sujet à régulation. Les homologues chez la drosophile des protéines Ras-like guanine nucleotide binding 3 et 10 régulent de manière négative la voie JAK/STAT en contrôlant le transport vers le noyau du facteur de transcription Stat92E [Baeg *et al.* 2005]. Plusieurs molécules contrôlent la capacité de Stat92E à fixer l'ADN. Par exemple, il a été montré que la protéine Not4 (homologue de CNOT4 chez les mammifères) était nécessaire à la liaison optimale de Stat92E [Grönholm *et al.* 2012]. Un autre exemple est la régulation de la fixation de Stat92E à l'ADN par la protéine Pias (Protein inhibitor of activated STATS ; homologue de PIAS chez les mammifères). Pias a été montré comme fixant les dimères de Stat92E phosphorylés, qui bloqués dans le cytoplasme ne peuvent jouer leur rôle d'activateur transcriptionnel [Betz *et al.* 2001]. Un dernier exemple est le facteur de transcription Ken and Barbie (Ken ; orthologue de BCL6 chez les mammifères) qui fixe les sites de liaison de certains des gènes cibles de Stat92E, empêchant ainsi leur transcription [Kotsyfakis *et al.* 2005 ; Ferrandon *et al.* 1998] (Figure 14).

Voie JAK/STAT et immunité humorale

Suite à un défi infectieux ou inflammatoire, la réponse immune humorale induit la production d'AMP par les cellules du corps gras. Ces inductions sont sous le contrôle des voies de signalisation IMD et Toll. Cependant, d'autres protéines immunitaires, tels que des cytokines et des protéines de réponse au stress, sont produites également dans les cellules du corps gras sous le contrôle de la voie JAK/STAT. Ces inductions sont sous le contrôle de la cytokine Upd3, qui est produite par les hémocytes en réponse à une blessure septique ou à un stress, comme une blessure aseptique [De Gregorio *et al.* 2002]. Parmi les gènes induits sous le contrôle de la voie JAK/STAT lors d'un stress, on retrouve la famille des protéines Turandot (Tot), dont l'expression est dépendante à la fois des voies JAK/STAT et IMD [Adams *et al.* 2000 ; Irving *et al.* 2001]. Ces protéines appartenant à une famille mal connue de protéines sécrétées sont présentes en grande quantité dans l'hémolymphe mais leur fonction exacte reste encore inconnue [Apidianakis *et al.* 2004 ; De Gregorio *et al.* 2002 ; Irving *et al.* 2001].

Voie JAK/STAT et immunité cellulaire

Pastor-Pareja *et al.* ont montré qu'une perturbation de la membrane interne des disques imaginaux de l'œil, chez la larve de la drosophile, par la présence d'une blessure ou d'une tumeur, est détectée par les plasmotocytes qui vont adhérer au site de blessure. Les cellules de la membrane, à ce site, induisent l'activation de la voie JNK et par conséquent la sécrétion des cytokines Upd. Ces cytokines activent la voie de signalisation JAK/STAT dans les hémocytes et les cellules du corps gras. L'activation de la voie JAK/STAT génère une boucle d'amplification qui induit une réponse systémique et une augmentation de la prolifération des hémocytes dont l'adhésion à la région endommagée permet de limiter l'entrée de pathogène pouvant entraîner une infection (Figure 15) [Pastor-Pareja *et al.* 2008].

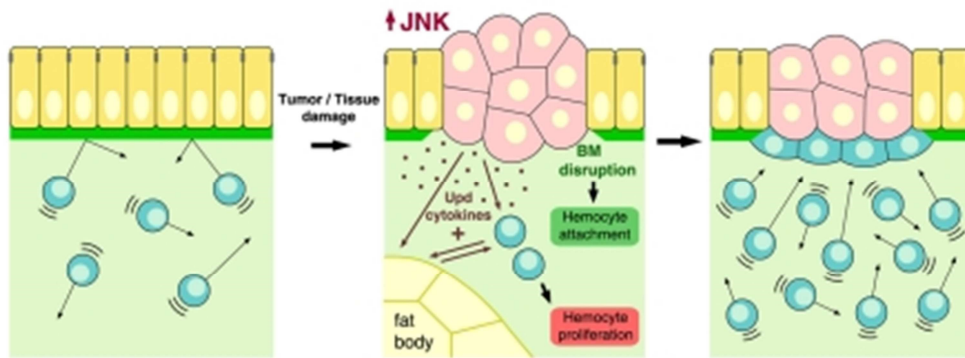


Figure 15 : La réponse à un dommage tissulaire chez la drosophile. Une lésion conduit à l'activation d'une réponse immunitaire dans les hémocytes. Les cellules lésées activent la sécrétion des cytokines Unpaired (Upd, Upd2 et Upd3) conduisant à l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT dans les hémocytes et le corps gras, qui, en retour, accroît l'expression des cytokines, amplifiant ainsi la réponse et induisant la prolifération des hémocytes. Les hémocytes adhèrent à la région endommagée après rupture de leur membrane basale (voir le chapitre Inflammation stérile chez la drosophile, Les blessures). Adapté de Pastor-Pareja *et al.* 2008.

Etudier le syndrome du sepsis chez la drosophile ?

Le sepsis est un syndrome auquel l'homme s'intéresse depuis longtemps. Le mot « sepsis » vient du grec *sepo* qui signifie « déclin, décomposition ou pourrissement d'un animal, d'un végétal ou d'une matière organique [Geroulanos and Douka 2006]. Pour Hippocrate, le sepsis se définissait comme le processus par lequel la chair pourrissait et les plaies cicatrisaient [Majno 1991]. Pour les gaulois, le sepsis était considéré comme un événement nécessaire pour la cicatrisation des blessures [Funk *et al.* 2009].

Selon les époques de l'histoire, le sepsis a porté différents noms. En 1199, on parlait de « gangrènes des hôpitaux » qui affectait notamment les soldats blessés sur les champs de batailles. Il fut aussi appelé « fièvre puerpérale » pour désigner une infection survenant chez la femme après l'accouchement. En 1869, deux médecins français, Victor Feltz et Léon Coze, démontrent la présence de bactéries dans le sang d'une femme atteinte de fièvre puerpérale. Louis Pasteur, en 1879, confirma ces observations en étudiant plusieurs cas dans des maternités différentes et préconisa l'hygiène lors des accouchements. Ce n'est qu'à partir de 1889 que le sepsis désigne un syndrome défini par des symptômes résultant de la réponse de l'organisme contre l'invasion par un pathogène d'origine bactérienne, fongique, virale ou parasitaire. Ainsi la réaction immunitaire de l'hôte est prise en compte et

considérée comme influençant le devenir infectieux [Angus and Van der Poll 2013]. L'interaction inflammation/infection est ainsi un point central dans la physiopathologie du sepsis.

Le sepsis est encore aujourd'hui un syndrome difficile à définir. Les études animales prometteuses ne débouchent pas sur des résultats probants chez l'homme car la pathologie humaine n'est pas bien reproduite par les modèles animaux. Les modèles animaux ont été critiqués car ils utilisent des individus sains, de même âge, de même état nutritionnel, soumis à des infections standardisées, se déroulant selon une séquence préétablie connue et d'évolution rapide, le décès étant attendu dans les heures, parfois dans les quelques jours qui suivent l'administration de l'infection. Pour les études chez l'homme, l'âge et le sexe des patients est, quant à lui, très hétérogène, tout comme les types d'infection, les types de bactérie, les pathologies sous-jacentes et associées. Typiquement, les patients souffrant de sepsis présentent quelques-uns des symptômes suivants : fièvre, anorexie, tachycardie, hypotension artérielle systémique, leucopénie, coagulation sanguine altérée.

J'ai réalisé une recherche dans la base de données Pubmed en utilisant les mots clés « sepsis » et « drosophila » dans les titres et abstracts des études référencées. 25 publications sont retournées, la première datant de 1982 et s'intitulant « *Drosophila myiasis mimicking sepsis in a newborn.* » [Clark *et al.* 1982]. Cette étude décrit la présentation à l'hôpital d'un nouveau-né, âgé de 8 jours, présentant une cellulite périorbitaire et des pustules cutanées due à une infestation par des larves de drosophiles.

Parmi les études très récentes qui ont retenu mon attention, j'ai relevé celle de Kaynar *et al.* en 2016 qui s'intitule : « Cost of surviving sepsis : a novel model of recovery from sepsis in *Drosophila melanogaster* » [Kaynar *et al.* 2016]. Les auteurs font le constat d'un manque de modèle d'étude des conséquences à long terme du sepsis (augmentation des risques cardiovasculaires, organisme favorable à de nouvelles infections, cancer et dysfonctions musculaires ou neurocognitives) et proposent donc un modèle d'étude chez des drosophiles mimant la phase de récupération qui suit le développement d'un sepsis. Ils ont donc étudié l'inflammation, les déficiences fonctionnelles, les dérèglements métaboliques ainsi que la survie de drosophiles mâles âgés de 4 à 5 jours infectés par piqure (sur le thorax) avec *Staphylococcus aureus* en les comparant à leurs homologues piqués

aseptiquement, ou infectés et maintenus sur un milieu nutritif contenant un antibiotique (linezolid). Plus précisément, ont été analysés la charge bactérienne sur un parcours de 0 à 72 heures, 7 jours et à 20 jours post-infection, la transcription (par qPCR) à 6, 18 et 48 heures et à une semaine post-infection et la traduction de gènes des voies inflammatoires et immunitaires (les récepteurs PGRP-SD et Toll, les AMPs Metchnikowin, Cecropin-A, Drosomycin et Defensin ainsi que la kinase Basket) et métaboliques (le récepteur de la voie de signalisation de l'insuline « Insulin-like receptor » (InR) et son ligand, la protéine Chico, PTEN, Akt1, Foxo, mTORC1), la motilité (en utilisant le test de géotaxie négative qui permet de mesurer la capacité des drosophiles à remonter le long d'un tube après avoir regroupé les mouches à la base du tube) et la survie (jusqu'à 60 jours) des drosophiles. Le métabolisme du glucose a aussi été analysé en mesurant les concentrations en glucose et glycogène, en protéine et en triglycéride ainsi que les concentrations en lactate et lactate déshydrogénase. Leurs résultats montrent que comparées aux drosophiles infectées sans traitement antibiotique, les mouches traitées par antibiotique présentent une meilleure survie dans la première semaine post-infection et, à 24 heures, une charge bactérienne plus faible que les drosophiles infectées sans traitement. Les mouches infectées et traitées par antibiotique ont une moins bonne capacité à se mouvoir que les mouches piquées de manière aseptique. Toutefois celle-ci devient comparable à 72 heures post-infection, ce qui indique que les drosophiles se rétablissent de l'infection. De manière intéressante, à une semaine post-infection, une inflammation persistante, chez les mouches infectées et traitées par antibiotique, est détectée. Elle est caractérisée par un niveau élevé de l'expression des facteurs de transcription NF- κ B Relish, Dorsal et Dif corrélé à une production d'AMPs (notamment la Drosomycine). Sont également observées chez les drosophiles infectées et traitées par antibiotique en comparaison avec les drosophiles piquées aseptiquement, la transcription continue de certains composants de la voie de signalisation de l'insuline (InR, Chico, Akt et mTORC1), une altération du métabolisme du glucose, une augmentation de la production de lactate et de l'activité de l'enzyme lactate deshydrogenase. La figure 16 illustre le modèle établi suite à ces observations, proposant que le changement d'aiguillage de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse aérobie puisse être le régulateur métabolique de l'inflammation.

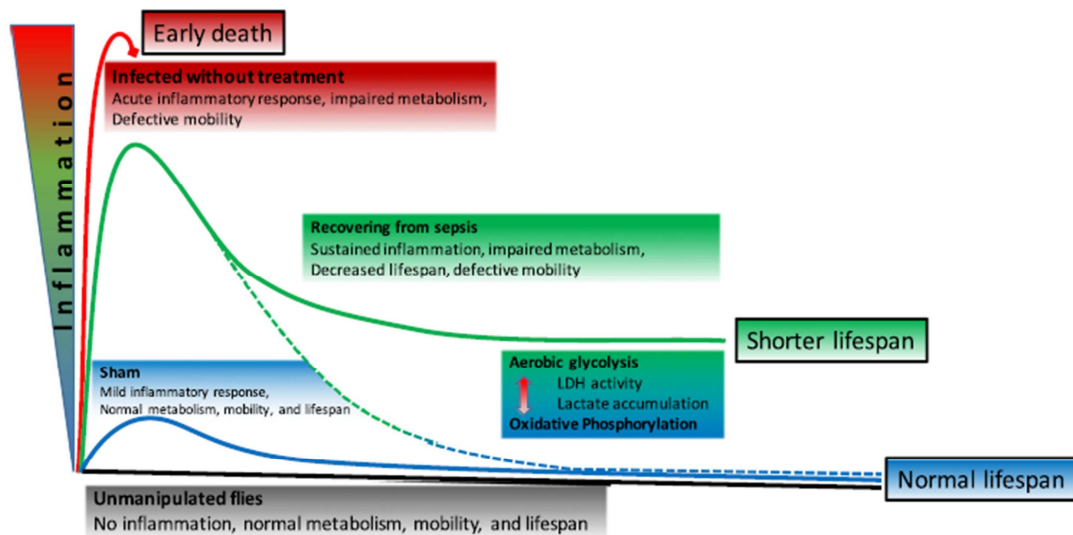


Figure 16: Interaction entre l'altération du mécanisme des carbohydrates et la persistance de l'inflammation chez les drosophiles suite à une infection par *Staphylococcus aureus*. Les drosophiles infectées et traitées par antibiotique (linezolid) survivent mieux (courbe verte, 'récupération après le développement du sepsis') que leurs homologues infectées mais non traitées par antibiotique (courbe rouge, 'mort précoce'). Ces mouches présentent une inflammation persistante et survivent moins bien que des drosophiles piquées aseptiquement qui ont une durée de vie normale (courbe bleue, 'blessure aseptique') et montrent une altération du métabolisme du glucose avec une plus grande production de lactate, une augmentation de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase. Adapté de Kaynar *et al.* 2016.

Mon but au cours de ma thèse a été d'étudier l'interaction entre inflammation et infection au cœur du syndrome du sepsis en m'intéressant plus particulièrement aux phases précoces de cette interaction et donc à la mise en place chez l'hôte de la réponse à une infection dans un contexte inflammatoire. Ma stratégie a été de réaliser des blessures et des infections par piqûres dans le thorax. C'est donc avec une attention particulière que je me suis plongé dans l'étude réalisée par Chambers *et al.* qui s'intitule « Thorax Injury Lowers Resistance to Infection in *Drosophila melanogaster* » [Chambers *et al.* 2014]. Ces chercheurs utilisent le modèle de la drosophile pour analyser l'impact du site d'infection sur sa progression en comparant des mouches qui reçoivent une infection par piqûre sur le thorax à d'autres recevant l'infection par piqûre dans l'abdomen. De manière intéressante, chez les mâles de drosophile âgés de 5 à 7 jours comme chez les femelles, ils mettent en lumière la susceptibilité induite par une infection dans le thorax comparée à l'abdomen qui se traduit par une charge bactérienne plus grande et une survie amoindrie. Ils ont réalisé des infections avec des pathogènes de virulence différente : « faible » avec les bactéries à Gram-négatif *Serratia marcescens* et *Salmonella enterica*, « modérée » avec la bactérie à Gram-négatif

Providencia rettgeri et la bactérie à Gram-positif *Enterococcus faecalis*, et « haute » avec les bactéries à Gram-négatif *Providencia sneebia*, *Providencia alcalifaciens* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les aiguilles utilisées pour induire les infections et les blessures aseptiques sont de même taille. Ils ont observé que la susceptibilité relative à une infection (par *P. rettgeri*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa*) effectuée au niveau du thorax, par rapport à l'abdomen, se crée dans les 3 premiers jours post-infection et que, passé ce délai, les mouches meurent de la même manière. Cette susceptibilité est également dépendante de la virulence bactérienne puisque le fait d'introduire une bactérie de faible virulence (*Serratia marcescens*) dans le thorax n'induit pas de mortalité aigue, alors que l'infection avec une bactérie de plus grande virulence (*P. aeruginosa*, *P. sneebia* et *P. alcalifaciens*) induit une mortalité aigue encore plus précocement que dans le cas de l'utilisation de bactéries modérément virulentes. De plus, en infectant les drosophiles avec des concentrations croissantes en bactéries de virulence modérée, ils montrent que cette susceptibilité est dépendante de la charge bactérienne administrée pour induire l'infection. Les auteurs font l'hypothèse que le site où est réalisé la blessure, le thorax, est central dans la mortalité accrue des drosophiles face à l'infection et ceci indépendamment du fait que l'infection soit induite au niveau du thorax ou de l'abdomen. Et en effet, en induisant une blessure aseptique sur le thorax suivie immédiatement par une infection (*P. rettgeri*) par pique, dans le thorax ou l'abdomen, la mortalité des mouches est plus prononcée que si la blessure aseptique est réalisée sur l'abdomen. Cette observation est accompagnée du fait que la charge bactérienne de ces drosophiles est significativement plus grande 24 heures post-infection, indiquant que la susceptibilité observée des drosophiles blessées au thorax puis infectées provient d'un défaut de résistance de l'animal face à l'agent pathogène.

Au niveau moléculaire, pour tester l'impact des processus immunitaires sur la susceptibilité induite par une blessure au thorax, les auteurs ont quantifié, par RTqPCR, les niveaux d'expressions de 5 AMPs (Diptericine, Defensine, Attacine-A, Metchnikowine et Drosomycine) à 6 heures et 12 heures post-infection dans le thorax ou l'abdomen et n'observent aucune différence significative. De plus, en réalisant l'expérience chez des drosophiles mutantes pour les voies de signalisation fondamentales de l'immunité innée, les voies Toll (mutant perte de fonction du gène codant la cytokine Spätzle) ou IMD (mutant

perte de fonction du gène *imd*), les auteurs constatent que même si l'ensemble des drosophiles montrent une plus grande mortalité face à l'infection, l'impossibilité d'activer ces voies de signalisation n'a pas d'effet sur la différence de survie mesurée entre les mouches infectées au thorax en comparaison à celles infectées dans l'abdomen ; les auteurs concluent donc qu'aucun des composants de l'immunité humorale n'est associé à cette susceptibilité. Sur le plan de l'immunité cellulaire, c'est la capacité à phagocyter un pathogène que les auteurs ont estimé en suivant la phagocytose suite à l'infection par la bactérie *E. coli* inactivée et marquée par un fluorochrome qui n'émet sa fluorescence que dans un environnement à pH acide comme le phagosome. La fluorescence est suivie au travers de la cuticule dorsale en utilisant un stéréomicroscope pour fluorescence. Aucune différence de fluorescence n'est observée quelque soit le site d'infection, thorax ou abdomen ce qui reflète l'absence d'altération de la capacité de phagocytose entre les deux conditions. Enfin, l'implication de la voie de signalisation JAK/SAT est testée en réalisant une blessure sur le thorax suivie d'une infection sur le thorax ou l'abdomen de mouches mutantes pour la cytokine Upd3 ; en absence d'activation de la voie JAK STAT, après une blessure au thorax : quelque soit le site d'infection, la susceptibilité des mouches n'est pas modifiée. Une voie de signalisation importante n'est pas analysée dans cette étude ; il s'agit de la voie de signalisation JNK qui est connue pour être impliquée dans la réponse cellulaire suite à une blessure [Rämet *et al.* 2002 ; Bosch *et al.* 2005 ; Apidianakis *et al.* 2007] mais également dans la réponse immunitaire humorale [Sluss *et al.* 1996]. Pour expliquer la susceptibilité des mouches suite à une infection par pique au thorax, 3 hypothèses sont proposées autour de l'allocation des ressources énergétiques: 1) La blessure au thorax pourrait induire un recrutement de nutriments à son niveau pour fournir l'énergie nécessaire aux processus de réparation tissulaire (cuticule et muscles du vol) et cette ressource énergétique pourrait être utilisée par la bactérie pour sa prolifération. 2) La blessure par pique au thorax entraîne des lésions au niveau des muscles du vol qui libèreraient les réserves de nutriments devenant accessible à la bactérie 3) Ainsi, le traitement de la blessure peut exploiter des ressources énergétiques qui pourraient, si elle n'existait pas, être utilisées uniquement par les processus de réponse à l'infection.

Il est intéressant de noter que le fait de piquer les mouches dans le thorax et d'altérer les muscles du vol, a un impact sur la résistance de l'individu face à l'infection. En 2007, Apidianakis et al. montrent que la voie JNK activée suite à une blessure ou une pique infectieuse au thorax régule l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la structure et la fonction des muscles comme l'Actine 88F, la Glutathione-S-transferase 2 ou la Troponine C (TnC at 41C), dès la première heure jusqu'à douze heures suivant la blessure [Apidianakis *et al.* 2007]. De plus, l'analyse de la réponse transcriptionnelle de drosophiles infectées par la souche virulente de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 par rapport à celles infectées par la souche non virulente CF5 ou blessées aseptiquement, montre que parmi les gènes différentiellement exprimés montrant une très forte sur-expression, 20 gènes sont impliqués dans la structure et la fonction des muscles [Apidianakis *et al.* 2005]. De manière intéressante, l'induction de l'expression de ces gènes, qui n'existe que si la blessure est induite au thorax et non à l'abdomen, varie suivant la souche bactérienne utilisée. L'infection par la bactérie PA14 conduit à l'induction de leur expression mais de façon moins prononcée que celle observée dans le cas d'une infection avec la souche CF5. Dès lors, se pose la question de l'implication des gènes codant ces protéines sarcomériques dans la susceptibilité de l'hôte face à l'infection. Des infections au thorax et à l'abdomen de drosophiles mutantes perte de fonction pour certains de ces gènes a pour conséquence une plus grande susceptibilité de l'hôte face à l'infection. Ainsi, une perte de fonction pour les protéines d'Actine (Act88F), constituant du sarcomère, de Tropomyosine (Tm2 liant l'actine sarcomérique [Williams *et al.* 2015]), de Troponines (TpnC41C) qui fixe le calcium, et de l'enzyme Glutathione S transferase S1 (GstS1) impliquée dans les processus de détoxification, est délétère pour la survie des drosophiles face à une infection induite par une pique dans le thorax [Apidianakis *et al.* 2007].

Des études ont montré la liaison de la voie JNK avec l'expression des gènes impliqués dans le développement musculaire chez l'embryon de la drosophile et avec l'expression du gène codant la Flightin (Fln), protéine spécifique des muscles indirects du vol, lors d'une infection [Jasper *et al.* 2001]. L'impact d'une mutation hypomorphe du gène codant Hemipterous (Hep), acteur de la voie JNK, a été analysé d'une part sur la survie des drosophiles infectées par la souche virulente de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 et d'autre

part, sur l'expression des gènes requis dans les muscles (quantifiée par qPCR), suite à une blessure ou à une infection avec la souche non virulente CF5. Outre le fait que les drosophiles mutantes hypomorphes pour *hep* montrent une survie significativement moins bonne comparées à leurs homologues sauvages lors d'une infection, aucune induction significative des gènes impliqués dans la structure et la fonction des muscles n'est observée ; ainsi, Hep est impliquée dans la susceptibilité de l'hôte face à une infection par piqure dans le thorax ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes des muscles suite à une blessure infectieuse ou non [Apidianakis *et al.* 2007]. De plus, des mouches exprimant une version dominante négative du gène *basket* (*bsk*) spécifiquement dans les cellules musculaires chez la drosophile adulte sont susceptibles à une infection réalisée dans le thorax et pas dans l'abdomen. Ainsi, Hemipterous (JNKK) et Basket (JNK) sont impliqués dans la protection face à une infection par *Pseudomonas aeruginosa* en induisant l'expression de gènes permettant la reconstruction tissulaire qui suit une blessure ou une infection [Apidianakis *et al.* 2007]. La figure 17 résume les résultats.

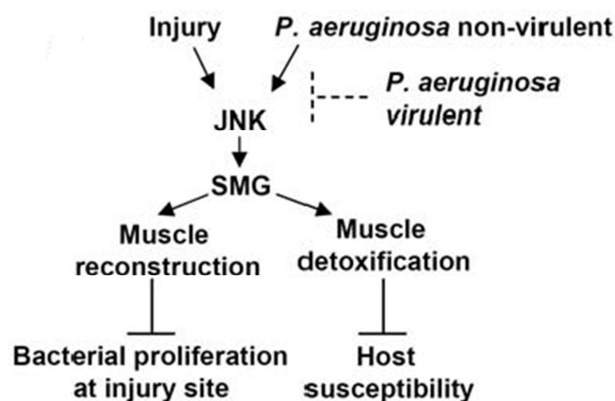


Figure 17: Schéma résumant le rôle proposé pour la voie JNK dans les mécanismes de réponse à la blessure et à l'infection. Lors d'une blessure ou d'une infection avec *Pseudomonas aeruginosa* dans le thorax des drosophiles, la voie de signalisation JNK est activée et induit la transcription des gènes impliqués dans la structure et la fonction des muscles squelettiques (SMG) jouant un rôle soit dans la reconstruction du tissu musculaire, ce qui a un impact sur la prolifération bactérienne au site de blessure, soit dans sa détoxification, ce qui a un impact sur la susceptibilité de l'hôte. Adapté d'Apidianakis *et al.* 2007.

Par quels mécanismes les muscles offrent ils une résistance à l'infection ? C'est la question posée dans l'étude de l'effet de la réponse à l'infection chez la drosophile sur les muscles indirects du vol (IFM) [Chatterjee *et al.* 2016]. Des mouches âgées de 2 à 3 jours, mutantes pour des gènes impliqués dans la structure et la fonction des IFMs, et présentant des phénotypes plus ou moins forts, de type hypercontraction jusqu'à l'absence totale des muscles, ont été utilisées. Dans ces contextes mutants, l'infection soit par la bactérie à Gram-négatif *Salmonella enterica*, soit par la bactérie à Gram-positif *Bacillus subtilis* a un effet délétère sur les survies des drosophiles infectées ce qui montre l'importance de ces muscles dans la résistance face à l'infection (Figure 18).

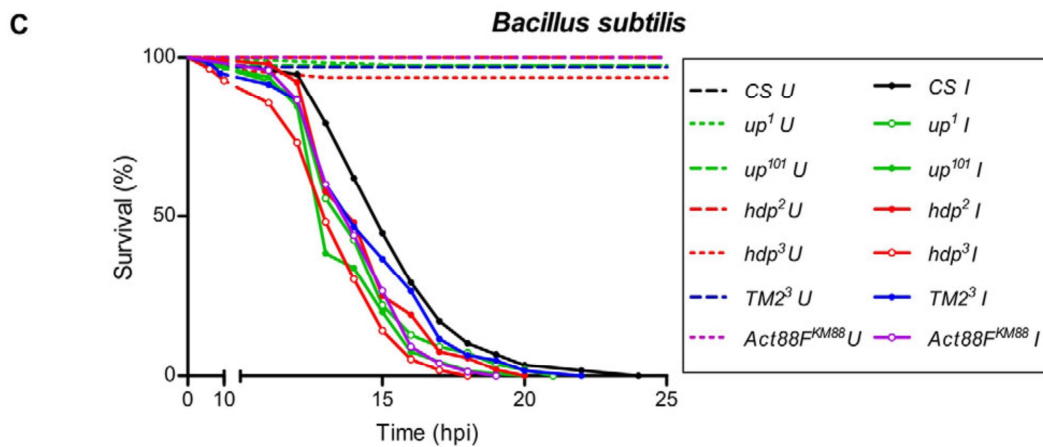
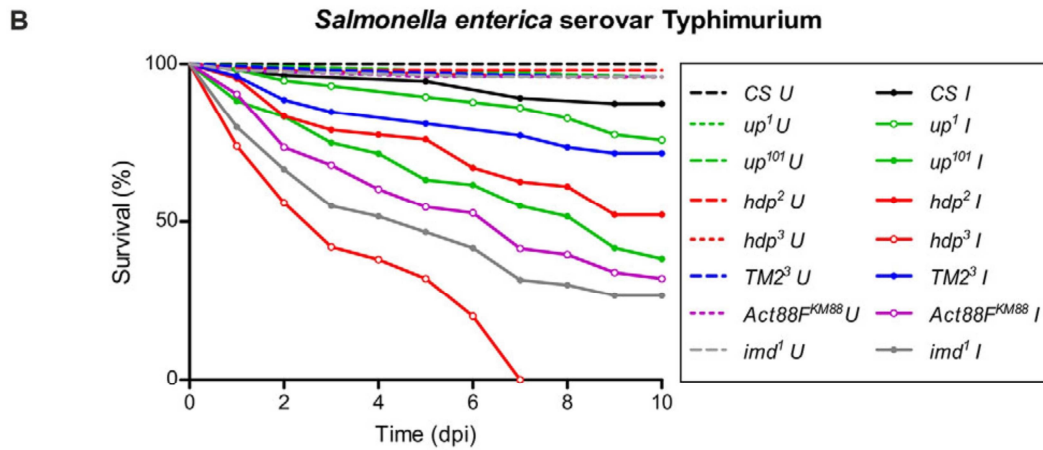
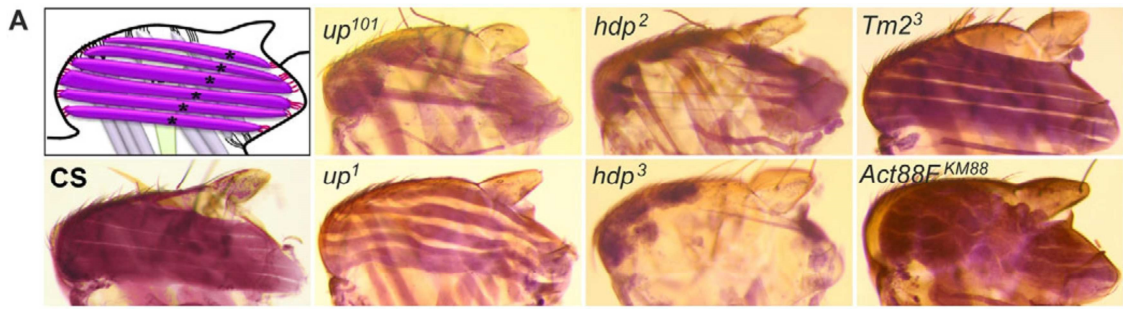


Figure 18: Les drosophiles mutantes pour des gènes codant des constituants impliqués dans la structure et la fonction des IFMs montrent une susceptibilité face à une infection de type bactérienne. A) Hémithorax des différentes lignées de drosophiles sauvage ou mutantes colorés à l'hématoxyline (coloration des éléments basophiles, comme la chromatine montrant la morphologie normale et plus ou moins altérée des IFMs. CS : sauvage ; Mutations ponctuelles dans la séquence codant la Troponine T, Upheld (Up):*up101* et *up1* ; *hdp2* et *hdp3*, mutations hypomorphes du gène heldup ; *Tm23* : mutation hypomorphe du gène codant la Tropomyosine 2 ; *Act88F^{KM88}* : mutation nulle du gène codant l'actine 88F. **B et C)** Courbes de survie des différentes mouches sauvages et mutantes infectées par *Salmonella enterica* (B) et par *Bacillus subtilis* (C) : Plus les défauts au niveau des IFMs sont prononcés, plus les mutants sont susceptibles à l'infection. U = unchallenged ; I = infected. Adapté de Chatterjee *et al.* 2016.

L'analyse du niveau de transcription, par RTqPCR, de gènes codant des AMPs (Cecropin et Drosocine, tous deux induits par la voie de signalisation IMD) montre que leur niveau d'expression est plus faible dans les mouches mutantes par rapport aux mouches sauvages dans un contexte infectieux (*Salmonella enterica*). De plus, le niveau d'induction de ces AMPs est d'autant plus faible que le degré d'altération des IFMs est important. L'inhibition médiée par ARNi, grâce au système UAS GAL4, spécifiquement dans les IFMs de l'adulte, des facteurs de transcription Dif et Relish entraîne une susceptibilité accrue face respectivement à une infection par *Bacillus subtilis* et *Salmonella enterica*, et des niveaux d'expression à 6 heures post-infection des gènes codants les AMPs Drosomycline, Metchnikowin, Defensin, Diptericin, Drosocin et Cecropin, significativement plus faible que celui de leurs homologues sauvages. Ainsi, les IFMs se révèlent être un tissu actif d'un point de vue immunitaire en étant capables d'induire les voies canoniques de signalisation immunitaire et la production d'AMPs produits essentiels pour la survie de l'hôte soumis à une infection.

Le rôle protecteur des muscles dans la résistance à l'infection semble être conservé au cours de l'évolution. En effet, l'expression, mesurée par RTqPCR, des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et l'IL1 β) ainsi que des cytokines anti-inflammatoires (IL10) et du récepteur TLR4a impliqué dans la réponse inflammatoire est fortement induite dans les myotomes du tronc de poissons zèbre (*Danio rerio*) âgés de 5 mois et infectés par piqure au niveau du tronc [Chatterjee *et al.* 2016].

Résultats

Résultats

Interaction entre trauma et infection chez la drosophile: rôle central de la voie de signalisation JNK et de CrebA.

Dans ce chapitre, je vais exposer le projet principal de ma thèse. Ce projet avait pour but d'étudier l'interaction inflammation/infection chez la drosophile afin d'essayer d'approcher les mécanismes moléculaires entraînant une susceptibilité à l'infection d'un organisme en état inflammatoire activé.

Au cours de ma thèse, mon propos n'a pas été d'étudier le sepsis à proprement parler dans la drosophile ou la souris, mais plutôt de mettre en place un modèle d'étude de l'interaction inflammation/infection où les événements inflammatoires et infectieux puissent être contrôlé le plus précisément possible afin de comprendre comment un organisme en état inflammatoire activé développe une susceptibilité face à une infection. Ainsi, au commencement de ma thèse, avec Séverine Garnier et Lydie Pradel, nous avons réalisé des expériences dites de « double-hit » chez la souris. Notre étude consistait d'abord à injecter de l'acide oléique (AO) pour promouvoir une réponse inflammatoire systémique (1^{er} Hit). Afin de connaître le timing des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, Lesur et al. ont étudié au laboratoire la réponse inflammatoire à l'acide oléique en quantifiant, par RT-Q-PCR, les niveaux d'expression de l'IL-6 et du TNF- α (cytokines pro-inflammatoires) ainsi que les niveaux d'expressions de l'IL-10 et l'IL-4 (cytokines anti-inflammatoires) [Lesur *et al.* 2010]. Les inductions de ces cytokines ont été mesurées dans les échantillons de poumons des souris injectées. Ainsi, le pic d'induction des cytokines pro-inflammatoires se situe autour de 1h30 post-injection d'AO tandis que celui de la réponse anti-inflammatoire se situe autour de 4h post-injection. Au moment des pics pro-inflammatoires ou anti-inflammatoire, nous avons induits une infection des souris par voie intrapéritonéale avec le plasmodium berghei ANKA (2nd Hit) et nous avons comparé les survies des souris « double-hit » à des souris contrôles n'ayant reçu que l'agent infectieux. Malheureusement, nous n'avons pas observé de différence et pour des raisons techniques (problème de reproductibilité due à la difficulté d'injecter l'AO dans la veine caudale), je

n'avais pas le temps au cours de ma thèse de mettre en place ce modèle d'étude de l'interaction inflammation/infection dans ce modèle animal.

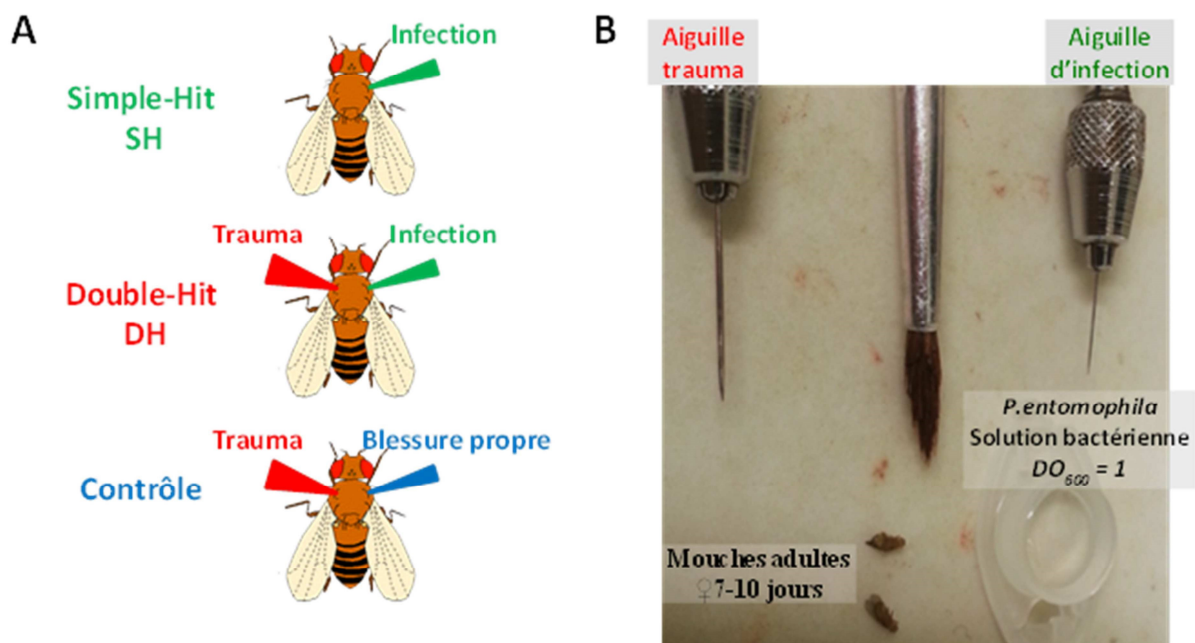
Au laboratoire, un autre modèle animal est utilisé pour étudier le développement cardiaque et sa régulation : la drosophile. Cet animal partageant l'immunité innée avec les mammifères, il m'a semblé intéressant de voir si un état inflammatoire actif chez la drosophile entraîne une susceptibilité à l'infection. Ainsi, dans un premier temps, j'ai décidé d'induire un événement inflammatoire avec une injection d'AO par pique sur le thorax de drosophiles femelles âgées entre 7 et 10 jours. Puis à différents points temporels (0H, 1H, 3H et 6H post-pique d'AO), j'ai induit une infection par pique au niveau du thorax des mouches. Cependant, ne connaissant pas les raisons pour lesquelles l'injection d'AO induit une inflammation, j'ai décidé de ne pas l'utiliser afin de minimiser les injections et de simplifier le modèles d'étude si possible.

Ainsi, mon choix s'est porté vers une pique aseptique sur le thorax mimant le trauma et une infection par pique, avec une minutie de plus petite taille plongée dans une culture de la bactérie Gram-négative *Pseudomonas entomophila* ramené à une DO (densité optique) à 600nm égale à 1, sur le côté opposé du thorax (Figure 19). Nous avons ainsi défini 3 groupes de mouches :

- **SH** pour « **Simple-Hit** » : Ces mouches reçoivent uniquement la pique infectieuse. Pour réaliser cette infection, les mouches sont maintenues sur un « paddle » relié à une pédale permettant de contrôler l'arrivée de CO₂ et ainsi de maintenir les drosophiles endormies pendant la manipulation. Consécutivement à l'infection, ces mouches sont placées dans des tubes, contenant un milieu nutritif, à raison de 10 mouches par tubes. Ces tubes sont placés dans un incubateur maintenu à 25°C durant l'observation.
- **DH** pour « **Double-Hit** » : Ces mouches reçoivent une pique aseptique sur un coté du thorax (activation de l'inflammation) et, dans la foulée, une pique infectieuse sur le côté opposé du thorax (activation de la réponse à l'infection). Ces mouches sont maintenues sur le « paddle » pendant que la manipulation est réalisée, puis sont placées, à raison de 10 mouches par tubes, dans des tubes contenant un milieu

nutritif. Ces tubes sont placés dans un incubateur maintenu à 25°C durant l'observation.

- **Contrôle** : Ce groupe est constitué de mouches ayant reçu la pique aseptique mimant le trauma et une pique aseptique, sur le côté opposé du thorax, de même taille que celle utilisée pour l'infection. Comme pour les autres groupes, ces mouches sont maintenues sur le « paddle » pendant la réalisation de l'expérience, puis sont placées, à raison de 10 mouches par tubes, dans des tubes contenant un milieu nutritif. Ces tubes sont ensuite placés dans un incubateur maintenu à 25°C tout au long de l'observation.



Le fond génétique des drosophiles ayant un fort impact sur la réponse à l'infection et à la blessure [Bou Sleiman *et al.* 2015], j'ai choisi d'établir le modèle d'étude avec la lignée W¹¹¹⁸, en utilisant des drosophiles provenant d'une même ponte. Afin de limiter les effets liés à l'âge, j'ai choisi d'effectuer cette étude sur des drosophiles jeunes, âgées de 7 à 10 jours. Mon choix s'est porté vers les femelles en raison de leur taille, plus grosses que les mâles et donc plus facile à manipuler. Cela m'a permis également de m'affranchir d'un effet du sexe des mouches testées, ce dernier pouvant influencer sur la réponse à la blessure et à l'infection.

J'ai donc observé les survies des drosophiles des différents groupes (contrôle, SH et DH) durant les 50 premières heures (Figure 20). De manière intéressante, les mouches DH montrent une susceptibilité face à l'infection en comparaison aux mouches SH (Figure 20A). Cette susceptibilité apparaît dans les 20 premières heures suivant l'infection et, par la suite, les survies des mouches DH et SH décroît de manière similaire. Les mouches contrôle, qui ont été piquées par deux fois de manière aseptique survivent à 100% tout au long de l'observation, illustrant le fait que la susceptibilité observée est basé sur l'interaction entre la réponse inflammatoire et celle à l'infection. De plus, en réalisant l'expérience avec des bactéries portées à 95°C pendant 30 minutes, les mouches DH ne montrent pas plus de mortalité que les mouches SH, confirmant que cette différence de survie n'existe que face à un événement infectieux virulent. Ainsi le trauma a pour conséquence l'augmentation de la mortalité des mouches lors d'une infection. Pour confirmer ce résultat, nous avons utilisé des minuties de différentes tailles pour réaliser le trauma, et nous avons observé que la susceptibilité à l'infection est proportionnelle à la taille de la blessure effectuée (Figure 20B).

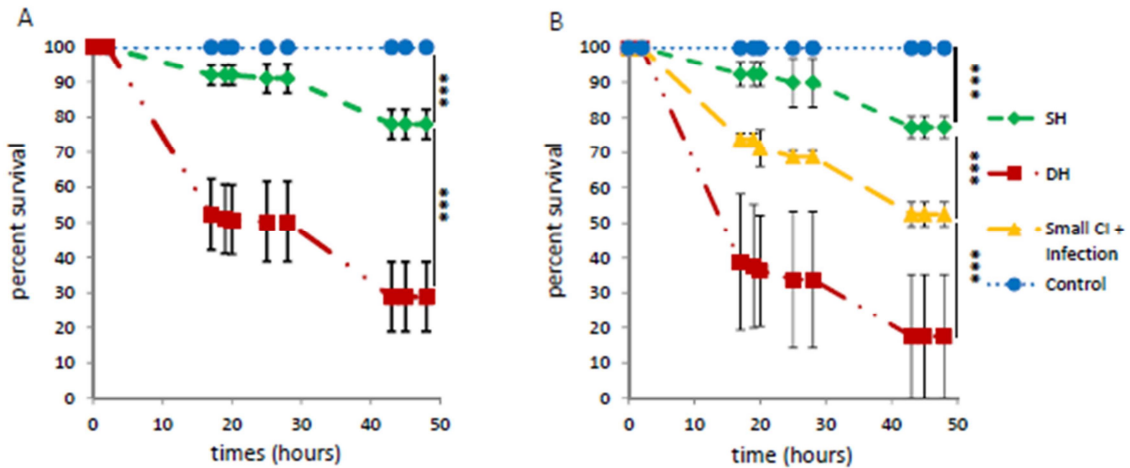


Figure 20: La blessure induit une susceptibilité à l'infection. A) Effet du trauma sur la survie de mouches infectées par la bactérie Gram-négatif *Pseudomonas entomophila*. La survie des mouches soumises à la fois à la blessure et à l'infection (DH, rouge) est compromise en comparaison aux mouches soumises à l'infection seule (SH, vert). Les mouches soumises à deux blessures aseptiques (Control, bleu) survivent à 100% tout au long de l'observation. Ces graphes représentent la moyenne de 10 expériences et, pour chaque expérience, 40 drosophiles par groupe ont été utilisées. B) Effet de la taille de la blessure sur la survie des drosophiles DH. En rouge est représentée la survie de drosophiles blessées avec une minutie large puis infectées avec une culture de *Pseudomonas entomophila* à une DO600 égale à 1. En jaune est représentée la survie de drosophiles blessées avec une minutie de plus petite taille puis infectées avec une culture de *Pseudomonas entomophila* à une DO600 égale à 1. Plus la taille de la blessure est grande, plus la survie des drosophiles décroît. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la méthode du Log Rank test avec le logiciel statistique R (***) $P < 0.001$.

Je me suis posé la question de la charge bactérienne des mouches des différents groupes étudiés (contrôle, SH et DH). En effet cette mortalité accrue des mouches DH peut être due à une incapacité (ou une capacité moindre) à combattre l'agent pathogène ou à une susceptibilité accrue à la virulence de *Pseudomonas entomophila*. Une incapacité à se défendre face à l'agent pathogène conduirait à une augmentation de la charge bactérienne dans les mouches DH en comparaison aux mouches SH. J'ai donc analysé les charges bactériennes des différents groupes de mouches à 0H, 6H et 24H après l'infection. Pour ce faire, j'ai broyé 3 mouches par condition dans 1mL de milieu de culture bactérien (Luria-Bertani ou LB). J'ai réalisé des dilutions en série de l'extrait de départ et j'ai étalé 100µL de chacune de ces dilutions sur des boîtes contenant du milieu de culture bactérien (LB agar). Après avoir mis les boîtes de culture dans un incubateur réglé à 30°C pendant 24H, les unités

formant des colonies (Colonie Forming Units ou CFU) sont comptées sur la boîte (Figure 21). Alors que les mouches SH et DH ont reçu au départ la même quantité de bactérie (approximativement 1000 CFU), j'ai observé que ces concentrations augmentent de manière similaire et sont au même niveau à 6H post-infection. Mais alors que cette prolifération bactérienne est contrôlée dans les mouches SH par la suite, celle des mouches DH augmente de manière exponentielle et, à 24H post-infection, elle atteint un niveau 3000 fois plus élevé que celle des mouches SH. Ainsi, la blessure a pour conséquence une baisse de la capacité des drosophiles à combattre l'infection.

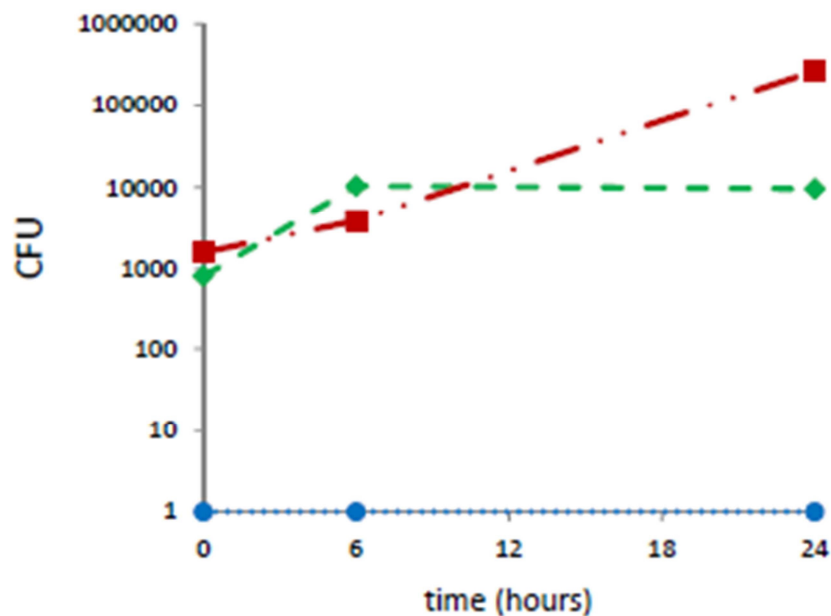


Figure 21: Les charges bactériennes des mouches SH (vert), DH (rouge) et contrôle (bleu) ont été mesurées à 0H, 6H et 24H post-infection. À chaque point temporel, 3 drosophiles par groupe ont été analysées. Tandis que la prolifération bactérienne est contrôlée dans le groupe SH à partir de 6H post-infection, elle croît de manière exponentielle pour les mouches DH. Les drosophiles contrôles, quant à elles, ne montrent pas de prolifération bactérienne, indiquant que la blessure stérile ne conduit pas à une infection qui serait non contrôlée.

J'ai ensuite entrepris d'étudier les mécanismes biologiques sous-jacents à la susceptibilité des mouches DH en comparant, par séquençage des ARNs messagers, le transcriptome de ces mouches avec les drosophiles SH et contrôle. Etant donné que la différence de survie entre SH et DH prend place dans les premières heures post-infection, j'ai choisi d'étudier ces mécanismes à 30min, 3H et 6H après avoir induit l'événement infectieux. J'ai donc extrait l'ARN total à partir de 15 mouches (divisées en trois répliques) pour les groupes DH, SH et contrôle pour chacun des points temporels. A partir de l'ARN total, et avec l'aide de Nicolas Fernandez-Nunez de la plate-forme TGML au TAGC, nous avons purifié les ARNm par sélection des queues poly-A. Nous les avons ensuite fragmentés en séquence de taille 200 nucléotides. Nous avons ensuite procédé à la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) et à leur amplification par PCR. Les bibliothèques ainsi générées ont été normalisées et séquencées grâce au séquenceur Illumina NextSeq-500 *via* la stratégie « single-end ». Les fichiers de séquences en sortie de séquenceur ont été convertis au format FASTQ. Nous avons obtenu des fragments de lecture (read) de taille 75 nucléotides que nous avons alignés au génome de référence de la drosophile dm3 grâce à l'outil Bowtie2 [Langmead *et al.* 2012]. Ces reads, ou fragments de lecture, ont également été assignés à des gènes grâce à cet outil. J'ai paramétré l'outil de manière à ce que ne soient pris en compte que les reads qui s'alignent entièrement et de manière unique sur le génome. J'ai procédé au comptage de ces reads grâce à la fonction FeatureCount de la suite Subread implémenté dans le logiciel statistique R (R statistical tool; <http://www.r-project.org/>). Pour chacun des points temporels (30 min, 3H et 6H), j'ai utilisé les outils EdgeR [Robinson *et al.* 2010] et DESeq2 [Love *et al.* 2014] afin de déterminer les gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes de drosophiles (SH, DH et contrôle). J'ai choisi d'utiliser ces deux outils pour augmenter la stringence de mon analyse et ne sélectionner que les gènes retrouvés comme différentiellement exprimés par les deux méthodes.

Mon analyse comparative a révélé 645, 786 et 449 gènes différentiellement exprimés entre les conditions SH, DH et contrôle pour les points temporels 30min, 3H et 6H respectivement. J'ai ensuite regroupé les gènes en groupe de profils d'expressions similaires (ou cluster) en utilisant la méthode des Kmeans [Soukas *et al.* 2000]. J'ai ainsi pu identifier 4 clusters à 30min, 3 clusters à 3H et enfin 3 clusters à 6H (Figure 22).

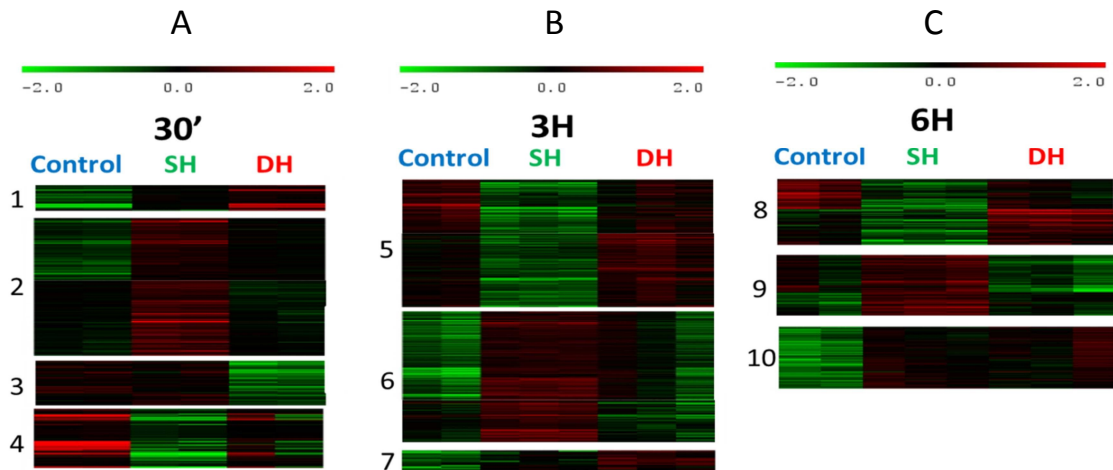


Figure 22: Profils d'expression des gènes différentiellement exprimés entre les conditions SH, DH et contrôle à 30min (A), 3H (B) et 6H (C). Chaque ligne représente un gène unique ((A) 545 gènes, (B) 786 gènes et (C) 450 genes). Les colonnes représentent les différentes conditions (contrôle, SH et DH). Le regroupement des gènes en profils d'expressions similaires a été réalisé en utilisant la méthode des Kmeans. Les expressions normalisées des gènes ont été transformées en logarithme en base 2 et sont codées en couleur. Par exemple pour le cluster 1, les gènes sont plus exprimés dans la condition SH par rapport à la condition contrôle (vert pour le contrôle et noir pour le groupe SH) et, ces mêmes gènes sont plus exprimés dans la condition DH par rapport à la condition SH (rouge pour la condition DH).

Pour analyser les caractéristiques fonctionnelles des différents clusters nous avons utilisé l'outil Flymine (<http://www.flymine.org>) et nous nous sommes intéressés en premier lieu aux termes GO (pour Gene Ontology). Grâce à l'outil iCisTargetX [Imrichová *et al.* 2015], nous avons recherché un enrichissement en site de fixation de facteur de transcription dans les régions non-codantes autour des gènes d'un même cluster, ce qui nous a permis d'émettre des hypothèse quant à la régulation de ces gènes.

Ces analyses suggèrent que les mouches DH activent, dès 30min, l'expression de gènes liés à la réponse au stress (Figure 22 ; Cluster 1). Celle-ci est exacerbé en comparaison au groupe SH. Les gènes inclus sous l'annotation de réponse au stress comprennent des membres de la voie JNK, ce qui révèle une implication potentielle de cette voie dans ce processus. Parmi ces membres, on retrouve des gènes tels que *gadd45* (Growth arrest and DNA damage-inducible 45, connus pour activer la voie JNK chez les mammifères et chez la drosophile [Peretz *et al.* 2007]) ou le gène codant pour le facteur de transcription Cabut (Cbt). En ce qui concerne la réponse immunitaire, l'annotation « réponse humorale antibactérienne » est retrouvée comme significative pour le cluster 2, où les gènes sont plus

exprimés dans le groupe SH par rapport aux groupes DH et contrôle (Figure 22 ; Cluster 2). Plusieurs AMPs sont retrouvés tels que les cecropines et les attacines, induits principalement lors d'infection avec des bactéries à Gram-négatifs [Lemaitre *et al.* 1997], ce qui est le cas de notre étude avec la bactérie *Pseudomonas entomophila*. On retrouve également les protéines de reconnaissance du peptidoglycan PGRP-SA et PGRP-SD, impliqué dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positifs [Bischoff *et al.* 2004] et la protéase à sérine SPE (Spätzle-Processing Enzyme), qui active la voie de signalisation Toll via le clivage de son ligand Spz (Spätzle) consécutive à une infection [Mulinari *et al.* 2006]. Ainsi, dès 30 min post-infection, la réponse immunitaire est mise en place dans les mouches SH, et non ou dans une moindre mesure dans le groupe DH.

La réponse au stress identifiée comme exacerbée à 30min post-infection, dans les mouches DH, mais également dans les mouches contrôles (i.e. piqure aseptique), est retrouvée au point temporel 3H (Figure 22 ; Cluster 5). En effet, comme à 30 min, on retrouve comme significative l'annotation de réponse au stress sous laquelle des gènes de la voie JNK, tels que le facteur de transcription Jra (Jun-related antigen, homologue de Jun chez les mammifères), la phosphatase Puckered (Puc) ou encore la protéine Gadd45, sont inclus. La réponse immunitaire est maintenue dans les mouches SH a un niveau plus élevée que le groupe DH (Figure 22 ; Cluster 6). Cette réponse inclus des gènes codant pour des AMPs (cecropines A1/A2/C, défensine, metchnikowin...) mais également des régulateurs de la réponse immunitaire connus (PGRP-SC1a, PGRP-SCAb et PGRP-SC2) [Bischoff *et al.* 2006]. De plus, grâce à l'outil iCisTargetX, nous retrouvons comme enrichie au sein, du cluster 6, des motifs de type GATA, suggérant une régulation de cette réponse immunitaire par des facteurs de transcription de cette famille, comme cela a été démontré dans une étude en 2006 [Senger *et al.* 2006].

Il a été intéressant d'observer l'implication des processus de transport membranaire, surexprimés dans le groupe SH par rapport aux autres conditions (i.e. contrôle et DH). En effet, une grande proportion des gènes du cluster 6 sont des cibles transcriptionnelles du facteur de transcription « Cyclic-AMP response element binding protein A » (CrebA), régulateur connue de la sécrétion [Fox *et al.* 2010]. Chez les mammifères, le facteur de transcription CrebA/CrebH est connu pour être impliqué dans la mise en place d'une réponse inflammatoire systémique [Zhang *et al.* 2006]. Il est vrai que CrebA n'est pas

retrouvé dans les gènes communs aux analyses EdgeR et DESeq2, mais si on regarde la liste de gènes identifiés uniquement par l'analyse EdgeR, *crebA* est significativement surexprimé dans la condition SH par rapport aux groupe DH et contrôle. Ainsi, les mouches SH, ne subissant que la pique infectieuse, induisent l'activation de processus de sécrétion probablement régulés par le facteur de transcription CrebA.

A 6H, nous retrouvons la réponse immunitaire activée dans le groupe DH par rapport au groupe SH (Figure 22 ; Cluster 8). Confirmant ce résultat, l'analyse iCisTargetX révèle comme enrichie pour ce groupe de gènes des motifs de fixation pour le facteur de transcription de type NF- κ B Relish mais il est possible que cette réponse reflète plutôt une réponse à l'inflammation, puisque ce groupe de gènes est exprimé de la même manière pour le groupe contrôle.

En résumé, ces analyses nous ont permis de voir que la réponse immunitaire était rapidement mis en place dans les mouches SH en comparaison au groupe DH. De manière intéressante, notre analyse montre que pour le groupe DH, ce sont des gènes enrichis pour des annotations relatives à la réponse au stress, incluant des membres de la voie de signalisation JNK et des gènes de la famille des HSP, que l'on retrouve activé à 30min et 3H post-infection. Nous avons également observé que le groupe SH active la transcription de gènes impliqués dans les processus de sécrétion, sous le contrôle du facteur de transcription CrebA.

Afin de valider les résultats obtenus par l'analyse du transcriptome, j'ai réalisé avec Alexandre Chuyen, étudiant en master 2, des expériences de double-hit sur des drosophiles gain-de-fonction ou perte-de-fonction pour des gènes impliqués dans la voie de signalisation JNK et pour le facteur de transcription CrebA. Pour ce faire, j'ai utilisé le système GeneSwitch permettant d'induire l'expression de transgène [Osterwalder *et al.* 2001 ; voir Figure 6], et de contrôler le moment de l'induction, ce qui permet d'éviter de possibles effets secondaires pendant le développement, la vie larvaire ou la métamorphose. Le transgène GS-gal4 étant placé à la suite d'une séquence promotrice ubiquitaire, cette expression est donc induite dans l'organisme entier de la drosophile. Après avoir observé que l'hormone utilisée pour induire le système GeneSwitch (RU486 ; hormone ajoutée dans le milieu nutritif des

drosophiles) n'avait pas d'effet sur la survie des drosophiles SH, DH et contrôle, nous avons pu tester l'impact d'une perte de fonction, d'une part, et d'un gain de fonction, d'autre part, du facteur de transcription Jra, retrouvé comme différentiellement exprimé entre les conditions DH et SH dans notre analyse à 3H, sur la survie de drosophiles SH, DH et contrôle (Figure 23). Nous avons réalisé une perte de fonction de Jra en induisant l'expression d'un ARN interférent, puis nous avons analysé les survies des mouches SH, DH et contrôle dans ce contexte. Nous avons pu observer que dans ce contexte, les mouches DH survivent mieux (Figure 23A) et ainsi leur survie devient comparable à celle des mouches SH. Ce résultat, qui confirme que la susceptibilité des mouches DH est en partie due à l'activation de Jra et d'autres membres de la voie de signalisation JNK, est confirmé par le fait que le gain de fonction de Jra a pour conséquence une diminution des survies des groupes DH et SH (Figure 23B et 23C).

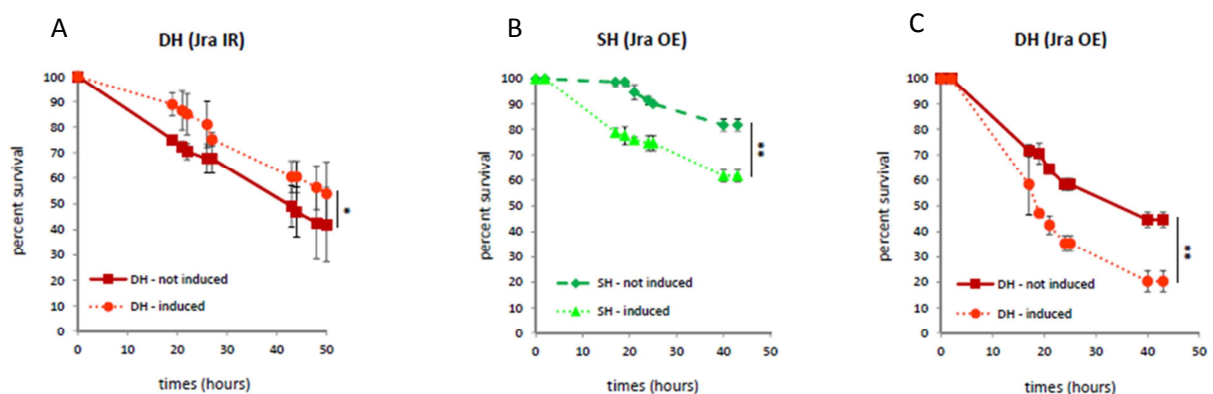


Figure 23: Impact de la modulation de la fonction de Jra sur la survie des mouches SH et DH. A) Graphe représentant les survies des mouches DH dans un contexte de perte de fonction (cercle) ou non (carré) pour Jra. En ordonnée est représenté le pourcentage de survie et en abscisse, le temps en heure. La perte de fonction de Jra a pour conséquence l'abolition de la différence de survie entre les groupes SH et DH. Celle-ci est due à une meilleure survie des mouches du groupe DH dans ce contexte B) Graphe représentant les survies des mouches SH dans un contexte de gain de fonction (triangle) ou non (losange) pour Jra. C) Graphe représentant les survies des mouches DH dans un contexte de gain de fonction (cercle) ou non (carré) pour Jra. Le gain de fonction de Jra est délétère pour les survies des mouches SH et DH. Chacun des groupes représentent 120 drosophiles analysées à travers 3 expériences différentes (40 mouches/groupe/expérience). Les analyses statistiques ont été calculés en utilisant la méthode du Log Rank test (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Les barres d'erreurs représentent les déviations standards.

Après avoir validé l'implication de Jra dans le phénotype DH, nous avons testé, de la même manière, les gains et pertes de fonction du facteur de transcription CrebA (Figure 24). La perte de fonction de CrebA a un effet délétère sur la survie des mouches SH (Figure 24A), mais n'a pas d'impact quant à la survie des mouches DH. Ainsi les survies des mouches SH et DH deviennent comparable dans ce contexte. Notre conclusion est que le facteur de transcription CrebA a une fonction majeure quant à la survie des drosophiles face à une infection par *Pseudomonas entomophila* et, en relation avec les résultats du transcriptome, que la susceptibilité des mouches DH face à l'infection est en partie due à une activité réduite de ce facteur de transcription. Cette observation est confirmée par le fait que, dans un contexte de gain de fonction pour CrebA, les survies des mouches DH et SH sont améliorées (Figure 24B et 24C).

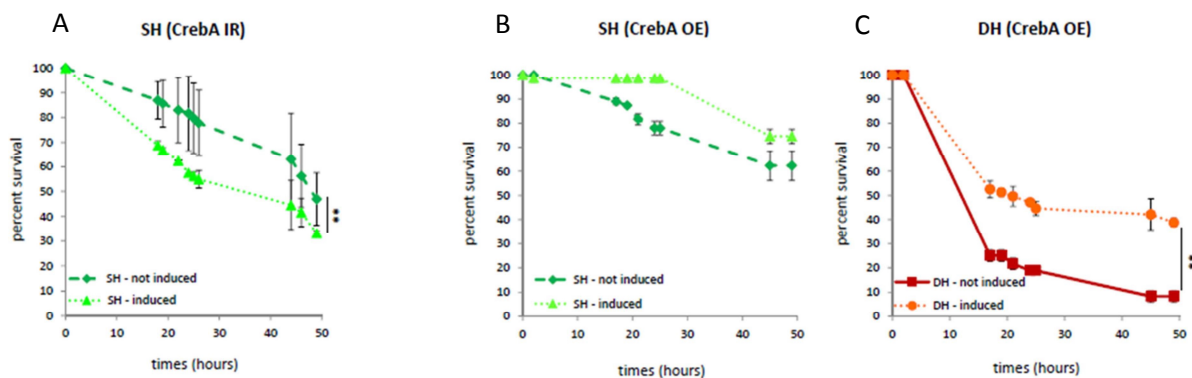


Figure 24: Impact de la modulation de la fonction de CrebA sur la survie des mouches SH et DH. A) Graphe représentant les survies des mouches SH dans un contexte de perte de fonction (triangle) ou non (losange) pour CrebA. En ordonnée est représenté le pourcentage de survie et en abscisse, le temps en heure. La perte de fonction de CrebA a pour conséquence l'abolition de la différence de survie entre les groupes SH et DH. Celle-ci est due à une moins bonne survie des mouches du groupe SH dans ce contexte B) Graphe représentant les survies des mouches SH dans un contexte de gain de fonction (triangle) ou non (losange) pour CrebA. C) Graphe représentant les survies des mouches DH dans un contexte de gain de fonction (cercle) ou non (carré) pour CrebA. Le gain de fonction de CrebA est bénéfique pour les survies des mouches SH et DH. Chacun des groupes représentent 120 drosophiles analysées à travers 3 expériences différentes (40 mouches/groupe/expérience). Les analyses statistiques ont été calculés en utilisant la méthode du Log Rank test (** $P < 0.01$). Les barres d'erreurs représentent les déviations standards.

Parce que chez les vertébrés la cytokine TNF- α a un rôle central dans l'immunité innée et l'inflammation [Newton et al. 2012] et que Anderson et al. ont récemment montré que la voie de signalisation JNK pouvait être activée par le récepteur transmembranaire de la cytokine Eiger (homologue du TNF- α chez la drosophile) Grindelwald (Grnd) [Anderson et al. 2015], nous nous sommes posé la question de l'impact de la modulation de la fonction de ce récepteur sur les survies des drosophiles SH, DH et contrôle. *Via* le système GeneSwitch, j'ai induit, chez des drosophiles femelles adultes âgées de 7 à 10 jours, l'expression de *grnd-extra*, une forme tronquée du récepteur transmembranaire dans laquelle il manque la partie intracellulaire (correspondant à une perte de fonction du récepteur). Ainsi le récepteur peut lier la cytokine Eiger, mais ne peut cependant pas induire la signalisation qui en résulte [Anderson et al. 2015]. La perte de fonction de Grnd a un effet délétère sur la survie des mouches SH mais n'impacte pas la survie du groupe DH (Figure 25A), ce qui pour conséquence d'abolir la différence entre les survies de ces deux groupes. Avec Alexandre Chuyen, nous avons confirmé l'implication de Grnd dans le phénotype DH en induisant, de la même manière que pour *grnd-extra*, l'expression de *grnd-intra*, une forme tronquée dans laquelle il manque la partie extracellulaire du récepteur et ayant pour conséquence une activation constitutive du récepteur. En effet, dans ce contexte, les survies des mouches SH et DH sont améliorées (Figure 25B et 25C). Ainsi nous avons découvert une nouvelle fonction du récepteur au TNF Grnd dans l'immunité innée des drosophiles. Cependant, étant donné que les effets observés sont opposés à ceux observés lors de la modulation de la fonction de Jra, nous n'avons pas retenu l'hypothèse de l'activation de la voie JNK *via* ce récepteur.

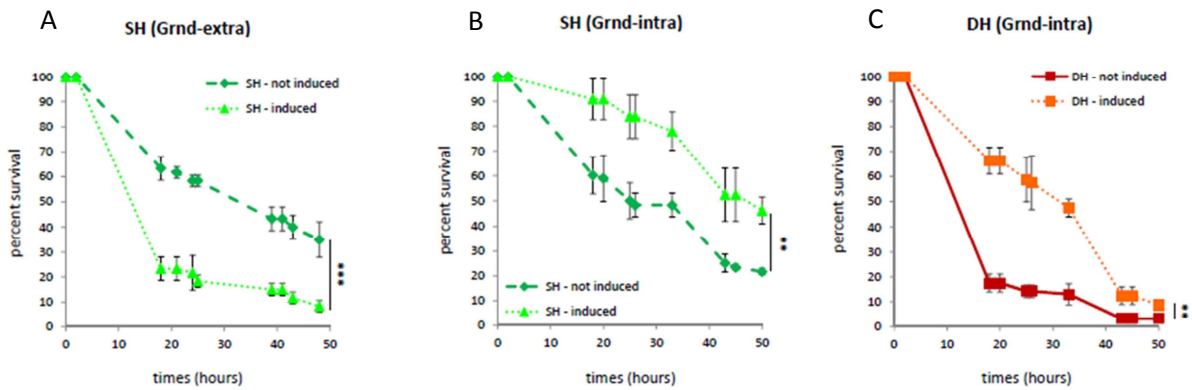


Figure 25: Impact de la modulation de la fonction de Grnd sur la survie des mouches SH et DH. A) Graphe représentant les survies des mouches SH dans un contexte dominant négatif (triangle) ou non (losange) pour Grnd. En ordonnée est représenté le pourcentage de survie et en abscisse, le temps en heure. L'induction d'un dominant négatif pour Grnd (Grnd-extra) a pour conséquence l'abolition de la différence de survie entre les groupes SH et DH. Celle-ci est due à une moins bonne survie des mouches du groupe SH dans ce contexte B) Graphe représentant les survies des mouches SH dans un contexte d'activation constitutive (triangle) ou non (losange) pour Grnd (Grnd-intra). C) Graphe représentant les survies des mouches DH dans un contexte d'activation constitutive (cercle) ou non (carré) de Grnd. L'activation constitutive de Grnd est bénéfique pour les survies des mouches SH et DH. Chacun des groupes représentent 80 drosophiles analysées à travers 2 expériences différentes (40 mouches/groupe/expérience). Les analyses statistiques ont été calculés en utilisant la méthode du Log Rank test (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Les barres d'erreurs représentent les déviations standards.

Les résultats obtenus ainsi que les approches utilisées pour ce travail sont discutés et mis en perspectives à la fin de ce manuscrit. Les pages qui suivent présentent la version non définitive de l'article associé à ce travail.

Interplay between trauma and infection in flies: a central role of the JNK pathway and of CrebA

Ramy Ragheb^{1,2}, Alexandre Chuyen^{1,2}, Arnaud Defaye^{1,2}, Denis Seyres^{1,2}, Nicolas Fernandez^{1,2}, Pascal Rihet^{1,2}, Catherine Nguyen^{1,2}, Laurence Röder^{1,2} *, Laurent Perrin^{1,2,3} *

¹ Inserm UMR_S 1090, TAGC, parc scientifique de Luminy, case 908, 13288 Marseille cedex 9, France.

² Aix-Marseille université, TAGC, parc scientifique de Luminy, 13288 Marseille, France.

³ CNRS, Marseille, France.

*Corresponding authors

Abstract

In mammals, both sterile wounding and infection induce inflammation and activate the innate immune system, and the combination of both challenges may lead to severe health defects, revealing that the balance between the intensity and resolution of the inflammatory response is central for the organism's fitness. The underlying mechanisms remain however elusive. Using *Drosophila*, we show that a sterile wounding induces a reduced resistance to a bacterial challenge and is accompanied by an increased host mortality upon infection. To identify the molecular mechanisms underlying the susceptibility of flies to combined trauma and bacterial infection, we analyzed the very first steps of the process by comparing the transcriptome landscape of infected (simple hit flies, SH), wounded and infected (double hit flies, DH) and wounded (control) flies. We observed that genes with an increased expression in DH flies compared to SH ones are significantly enriched in genes related to stress, including members of the JNK pathway. We further demonstrate that the JNK pathway plays a central role in the DH phenotype by manipulating the *Jra/dJun* activity. Moreover, the *CrebA/Creb3*-like transcription factor (TF) and its targets were up-regulated in SH flies and we show that *CrebA* is required for mounting an appropriate innate immune response. We also investigated the role of the *Drosophila* TNF receptor *Grindelwald* (*Grnd*) in SH and DH phenotypes. Our results reveal its function in innate immune response since SH flies with reduced *Grnd* function displayed a reduced viability upon infection. *Drosophila* thus appears as a relevant model to investigate the complex interactions between trauma and infection and allows to unravel key pathways involved.

Introduction

In mammals, infections trigger an inflammatory response which activates the innate immune system. The host response to infection occurs through PAMP (Pathogens Associated Molecular Patterns), which are agonists for host receptors, such as Toll like receptors (TLRs). It has recently been recognized that the same pathways are also able to respond to host molecules (DAMP (Danger-Associated Molecular Pattern), which accumulate during cell injury and death, leading to the inflammatory response consecutive to tissue injury and the innate immune system activation [Chen and Nuñez 2010]. Indeed the initial host response to infection is very similar to that of sterile inflammation consecutive to severe trauma, burn, as well as reperfusion of ischaemic tissues or other forms of tissue damages that lead to cell necrosis [Anderson and Tracey 2011].

Importantly, the balance between the intensity and resolution of the inflammatory response is central for the organism's fitness. For instance, morbidity and mortality due to sepsis is likely caused by an excessive host pro-inflammatory response to an infection in the first few days [Ward 2012 ; Rialdi *et al.* 2016]. In addition, increasing evidence supports a central role of immunosuppression in sepsis, and it has been proposed that immunosuppression may be involved in late deaths [Boomer *et al.* 2011]. Since infection and sterile inflammation share common cellular and molecular pathways, it is not surprising that the occurrence of both a sterile injury and an infection can lead to increased risks of sepsis in humans [Wafaisade *et al.* 2011]. Indeed, combining both threats may increase the risk of hyper-inflammatory response. However the mechanisms that are involved in this conflicting interplay between trauma and infection which culminate in an uncontrolled inflammatory response remain unknown.

Innate immunity has emerged as the defensive frontline that coordinates the responses to both injury and infection and is evolutionary conserved. Pioneering work in *Drosophila* has paved the way for the identification of TLRs and other pathways central for the innate immune response following infection in animals [Lemaitre *et al.* 1996]. Recent advances pointed out that *Drosophila* are also able to mount an inflammatory response to wounding [Stramer and Dionne 2014; Shaukat *et al.* 2015]. In flies, sterile inflammation involves the recruitment of circulating immune cells which are able to clear debris [Pastor-

Pareja *et al.* 2008], and the activation of an humoral response which involves innate immune pathways and culminates in the secretion of antimicrobial peptides (AMP) [Stramer *et al.* 2008]. Importantly, it has been demonstrated that uncontrolled systemic wound response is detrimental to flies survival [Takeishi *et al.* 2013] and previous work established that sterile wounding can have adverse effects on flies survival to infection [Apidianakis *et al.* 2007].

An important issue is to identify the molecular pathways which are involved in the very first steps of the systemic response to hyper-inflammation. In this study, we set up a robust assay to analyze the interactions between trauma and septic injury in *Drosophila*. We show that flies subjected to both a sterile trauma and a septic injury (double hit flies, DH) are less resistant to an infection compared to flies subjected to septic injury alone (simple hit flies, SH), suggesting that, in flies also, acute inflammation has adverse effect on the ability to fight a pathogen. To investigate the molecular pathways involved, we further compared the transcriptome landscapes of DH, SH and control (only wounded) flies. This pointed out a delayed immune response and an exacerbated stress response in DH flies. In particular, the JNK pathway was up-regulated in DH flies. By manipulating Jra /dJun activity in adult flies, we provide evidence that the JNK pathway activation is instrumental in the sensitivity to infection of DH flies. In addition, the CrebA/Creb3-like TF and its targets were up-regulated in SH flies and we show that CrebA is required for mounting an appropriate innate immune response. We also investigated the potential role of the TNF receptor Grindelwald (Grnd) in DH flies and unravel its function in innate immune response. *Drosophila* thus appears as a relevant model to investigate the complex interactions between inflammation and infection and allows to unravel key pathways involved in the development of a hyper-inflammatory state.

Material and methods

Fly strains and maintenance. Fly rearing and crosses were performed on standard cornmeal agar yeast food and the flies were raised at 25°C. The w^{1118} ; canton S isogenic line (w^{1118} , Monnier *et al.* 2012) was used as a wild-type genetic background. In the study of survival of transgenic lines, the w^{1118} strain was systematically considered as positive control of the DH experiment; the reproducibility of w^{1118} flies survival rates in DH conditions allowed to ensure a constant pathogenicity of the Pe bacteria between experiments. Infections were carried out at a similar time of day across experimental replicates in order to avoid the influence of circadian rhythm on the drosophila immunity response.

The following transgenic flies were obtained as indicated for use in this study: UAS-*jra*^{RNAi} (VDRC# 107997); UAS-*grnd*^{RNAi} (gift from J. Colombani; VDRC # GD43454); UAS-*CrebA*^{RNAi} (TRiP JF02189, Bloomington # 31900); UAS-*CrebA* (gift from D. Andrew), UAS-*Jra* (Bloomington # 7216), UAS-*grnd*^{extra}, UAS-*grnd*^{intra} (gift from J. Colombani [Andersen *et al.* 2015]). We used the ubiquitous tubulin-GeneSwitch Gal4 driver line (Tub-GS, Flybase # Fbti0145090) to activate the different Upstream Activating Sequence (UAS) transgenes [Osterwalder *et al.* 2001] by adding RU486 (Mifepristone, SIGMA) in the food at 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml or 200 µg/ml in the food at adulthood (see Monnier *et al.* 2012).

Bacterial culture. The Gram-negative bacteria *Pseudomonas entomophila* (Pe) was a kind gift of Dr A. Gallet. Pe suspension was prepared in Luria-Bertani broth from frozen glycerol stock. Bacteria were spread on LB agar plate supplemented by 1% of dry milk and were grown overnight at 30°C. The presence of a translucent halo around a colony allows to easily spot a strong caseinase activity of the bacterial colony which is a mark of their virulence. Starter cultures were made up by inoculating 40ml of LB into a sterile 250ml conical flask with a single colony from the agar LB plate and were grown up 8h in an orbital shaker set at 250 revolution per minute (rpm) at 30°C. Overnight liquid cultures were prepared by inoculating 187.5 ml of LB broth in a sterile 1 l conical flask with 12.5 ml of starter culture and were grown at 250 rpm at 30°C. Bacteria were allowed to grow up to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) comprised between 7 and 10 and the OD₆₀₀ was then adjusted to 1 for infections.

Sterile wounding and infections. All experiments used 7 to 10 days-old adult females flies manipulated at room temperature (23°C) upon CO₂ anesthesia. Flies were pricked with tungsten needles on thorax side. The sterile injuries (clean injuries, CI) were produced by pricking flies with a 0.3 mm diameter needle (large needle). A 0.1 mm diameter needle (small needle) dipped into the 1 OD₆₀₀ bacteria culture was used for the infection. Double hit (DH) flies were pricked with sterile needle and infectious needle on each side of the thorax. The control sham flies were pricked with both sterile large and small needles [Apidianakis *et al.* 2009].

Fly survival and bacterial charge measurement. Fly survival was determined on groups of 40 manipulated flies (in 4 batches of 10 flies per vial) for up to 50 hours at 25°C. Flies that died within 2 h after manipulation were excluded from the analysis. To determine the bacterial load in manipulated flies, a sample of 3 flies per group were collected at 0h, 6h and 24h after manipulation and were crushed in 1 ml of LB broth. 10-fold serial dilutions of samples suspension were made and 100 µl plated on LB agar. Colonies were counted after 24h at 30 °C.

Statistical analysis Statistical analysis of survival rates between different batches of manipulated flies was performed using R project software (<http://www.r-project.org/>). For comparing the fly groups, the survival curves were analyzed by the Log Rank test method [Bland and Altman 2004] in order to test the null hypothesis that the survival kinetics of the different populations of flies (the probability of the “death” event at any time point between the different batches) are equivalent. In each group and for each time point, the observed number of death and the expected number of death predicted by the null hypothesis were calculated. Then, total numbers of expected deaths (E) and observed deaths (O) in each group were calculated. The method next relies on the use of a χ^2 test of the null hypothesis, based on the calculation of the sum of $(O-E)^2/E$ for each group, the degrees of freedom being the number of groups minus one. The P-value was calculated for the overall time course, from a Table of the χ^2 distribution. This P-value represents the probability of flies randomly selected from those predicted by the null hypothesis to have survival curves different to those actually observed. Difference between the groups was considered statistically significant if the P-value was lower than 0.01.

RNA sequencing. Total RNA was isolated, using TriZOL chloroform extraction (Ambion), from 15 flies for each condition (i.e. sham, SH and DH) divided into 3 biological replicates at 30 min, 3h and 6h post experiment. mRNA population was purified through a polyA selection and was fragmented into sequences of 200 nucleotides. After cDNA synthesis and its amplification by PCR, libraries were normalized and sequenced using Illumina NextSeq-500 sequencer, through a single-end strategy (<http://www.illumina.com/systems/nextseqsequencer.html>). High throughput sequencing was performed at the TGML Platform, supported by grants from Inserm, GIS IBiSA, Aix-Marseille Université, and ANR-10-INBS-0009-10.

RNAseq analysis. Illumina sequence files were converted into FASTQ format. The short sequence reads (75 nucleotides) were aligned to the *Drosophila* reference genome (*dm3*; <http://genome.ucsc.edu/>) and assigned to genes using Bowtie (version 2) [Langmead *et al.* 2012] with the following parameters:

```
--end-to-end --sensitive --no-unal -t -k 1 -q -U. Preset '--sensitive' option ensures good sensitivity and fast processing. End-to-end argument is required in order to align the entire read length. No-unal argument allows discarding reads that failed to align and -k 1 argument allows read to align once.
```

We used the Subread package (R statistical tool; <http://www.r-project.org/>) to count aligned reads. For each time point (0h, 3h and 6h), differentially expressed genes were identified by the use of the R packages EdgeR [Robinson *et al.* 2010] and DESeq2 [Love *et al.* 2014]. We used no fold change filtering and results were corrected for multi-testing by the method of the False Discovery Rate at the 5% level. Clustering were done using TIGR Multiexperiment Viewer tool (MeV) [Saeed *et al.* 2003]. Differentially expressed genes were clustered using the unsupervised classification method of the Kmeans [Soukas *et al.* 2000]. Functional annotation enrichment for Gene Ontology (GO) terms were realised using Flymine database [<http://www.flymine.org/>; Lyne *et al.* 2007]. Benjamini-Hochberg corrected P values of less than 0.05 were considered significant. We also used *i-cisTarget* tool [Imrichová *et al.* 2015] to look for enrichment in TF (TF) position weight matrices and potential binding sites in the regulatory regions of co-expressed genes. *i-CisTargetX* computes statistical over representation of DNA motifs and ChIP-seq peaks in the non-coding DNA around sets of

genes [Imrichová et al. 2015]. The enrichment was considered significant when the Normalized Enrichment Score (NES) was higher than 5.

Results

Wounding reduces survival upon infection in flies

To analyze a possible interaction between trauma and infection in *Drosophila*, we compared the survival rate of 1 week wild-type adult females infected by pricking with *Pseudomonas entomophila* (Pe) (Simple Hit flies, SH) to that of littermates that have been wounded in the thorax using a sterile needle before being infected (Double Hit flies, DH). Fly survival was analyzed during the first 50 hours following manipulation. As shown in Figure 1A, DH flies displayed a much reduced viability compared to SH flies ($P < 2e^{-16}$), and the effect was more pronounced during the first 20 hours after trauma and infection. Control sham flies, which were first wounded and then pricked with a sterile needle instead of being infected with Pe, displayed no mortality during this time course. Moreover, when a heat-killed Pe culture was used, DH flies displayed no acute mortality compared to SH ones (Figure S1). Thus, trauma increased flies mortality during virulent infection and not upon infection with dead bacteria. This indicates that the trauma consecutive to thorax wounding increases the susceptibility of flies to an infection. In support of this, we observed that this was proportional to the size of the wound. Indeed, using a smaller needle for the aseptic wound led to reduced effect on the mortality of flies (Figure 1B).

Trauma induced increased mortality upon infection could be due either to a reduced ability of flies to eliminate the pathogen (reduced resistance) or to a lower tolerance to Pe. Reduced resistance should lead to increased bacterial load in DH flies compared to SH ones. We therefore analyzed the bacterial load of SH, DH and control flies during the first 24 hours following infection (Figure 1C). Remarkably, while DH and SH flies had received similar amount of bacteria (approximately 1 000 CFU, not shown), we observed a 5 to 10 fold bacterial load increase respectively in DH and SH flies at 6 hours. While bacterial load was controlled in SH flies at 24 hours, it increased exponentially in DH flies (Figure 1C). A Mann-whitney analysis showed that the adjusted CFU of DH flies was significantly higher than the one of SH flies ($P=0.01$). This indicates that wounding-induced trauma lowers fly resistance to infection.

Identifying molecular signatures of SH and DH phenotypes using RNAseq.

To investigate the mechanisms that may lead to reduced resistance to bacterial infection in DH flies, we analyzed and compared the transcriptome landscape of SH, DH and control flies. We focused on the early response to trauma and infection challenges and therefore determined gene expression at 30 minutes, 3 hours and 6 hours after treatment. Single-end mRNA sequencing was performed on mRNA purified from whole *Drosophila* wild-type females at the three time points. After sequence reads alignment on the reference genome, reads counts were normalized to identify differentially expressed genes using both EdgeR and DESeq2 tools. We considered genes identified by both methods in order to increase the stringency of the analysis. Through this comparative analysis of the data, corrected for multi-testing with a FDR of 5%, we found 645, 786 and 449 genes differentially expressed at least in one group (SH, DH or control) at 30 minutes, 3 hours or 6 hours respectively (Table S1). For each time point, differentially expressed genes were clustered into similar expression profiles using Kmeans clustering, identifying 4 clusters at 30 minutes, 3 clusters at 3 hours and 3 clusters at 6 hours (Table S2 and Figure 2).

To analyze the functional characteristics of genes with similar expression pattern, we searched for biased representation of gene function annotations within individual expression clusters using Flymine (<http://www.flymine.org>) and focused on enrichment for Gene Ontology terms (Table 1). We also used *i-cisTarget* method to identify transcriptional regulatory motifs enriched in these genes clusters, and to propose putative TFs involved in their co-regulation (Table 1).

Immediate early response to trauma and infection:

The 645 genes differentially expressed between SH and DH flies at 30 minutes, corresponding to genes of the 'immediate early' response to the challenges, were partitioned into 4 clusters.

Cluster 1 contains genes highly expressed in DH flies compared to both SH and controls (Figure 2A). This gene set is enriched in GO annotation associated with 'response to stress' ($P = 2.10e^{-3}$) (Table 1). Of note, among these genes, several are known actors of the

JNK signaling pathway (*Gadd45*, *Hsromega* and *Cabut*) while a number of genes participating in the heat shock response were also retrieved (*Hsp70Ab*, *Hsp70Bb*, *Hsp70Aa*, *Hsp70Ba*, *Hsp70Bc*, *Hsp70Bbb*). Interestingly, among the position weight matrices (PWM) significantly outlined by *i-cisTarget* within cluster 1, one is predicted to bind the Heat Shock Factor (Hsf, Table 1). Overall, these functional annotations suggest that combining trauma and infection in DH flies exacerbates the stress response compared to the other situations, where trauma and infection were inflicted separately to the flies.

Cluster 2 corresponds to genes showing higher expression in SH fly population compared to DH and control and is enriched in genes involved in the anti-bacterial humoral response ($P = 2.79e^{-5}$) (Table 1), including those coding for Diptericin B (*DptB*), Cecropin A1/A2/C (*CecA1*, *CecA2*, *CecC*), Attacin A/B/C (*AttA*, *AttB*, *AttC*). Interestingly, cluster 2 also comprise genes encoding the Peptidoglycan-Recognition Protein-SA (*PGRP-SA*) and Peptidoglycan-Recognition Protein-SD (*PGRP-SD*), which are involved in the recognition of Gram positive bacteria molecular pattern [Bischoff *et al.* 2004], and the gene coding for the Spätzle-Processing Enzyme (*SPE*), which activates the Toll signaling pathway through the cleavage of its ligand Spätzle (*Spz*) after an infection [Mulinari *et al.* 2006]. *Turandot A/C* genes (*TotA*, *TotC*) are also part of cluster 2. They are known to be strongly induced upon bacterial challenge [Ekengren *et al.* 2001]. This suggests that as early as 30 minutes after infection, the protective innate immune response is efficiently mounted in SH flies, but not in DH ones.

Cluster 3 is composed of 84 genes down-regulated in DH flies compared to SH and control populations. This cluster is enriched in genes annotated as participating in eggshell formation ($P = 10^{-7}$) (Table 1), what may support a stress induced down-regulation of the reproductive status of DH females compared to both SH and control ones. Noticeably *i-cisTarget* analysis indicated that non-coding sequences of genes in cluster 3 are enriched for both Tata Binding Protein (TBP) and TBP associated factor 1 (Taf1) binding motifs which are hallmarks of actively transcribed genes. This suggests that this cluster is comprised of genes that are usually actively transcribed by RNA polymerase II and may therefore be actively down-regulated upon combined trauma and infection.

The 147 genes of cluster 4 had a reduced expression in SH flies compared mainly to control ones and are enriched in GO annotation corresponding to 'tissue development' ($P = 0.03$) (Table 1). As in cluster 1, *i-cisTarget* method retrieved an enrichment for Hsf protein binding motif in the non-coding region of this gene set suggesting that a part of them are transcribed downstream this stress pathway. In addition, binding motif for the zinc finger TF Ken and barbie (Ken) - a potential modulator of the JAK/STAT pathway [Arbouzova *et al.* 2006] - is enriched in the non-coding sequences of cluster 4 genes. Finally *i-cisTarget* also retrieved the Blimp-1 protein binding motif. Blimp-1 is a transcriptional repressor recently identified as involved in precise timing of gene expression during *Drosophila* pupation [Akagi *et al.* 2016]. It could therefore also be implicated in the controlled expression of these immediate early genes which display dynamic expression within the first 30 minutes of the experiment.

Early response to trauma and infection:

At 3h, 786 genes were found to be differentially expressed and their expression profiles are divided into 3 clusters (Figure 2B).

Cluster 5 is composed of 355 genes down-regulated in SH flies compared to both DH and control ones. The GO enrichment analysis revealed the term 'response to stress' as being enriched ($P = 0.02$) (Table 1). As for cluster 1, several genes of this set belong to the JNK pathway: *Gadd45*, *Jun-Related Antigen (jra*, the *drosophila* Jun orthologous gene), *Cabut*, *Puckered (Puc)* and *Hsromega*. Noteworthy, binding motifs for the bZip TFs ATF3 and Kayak (Kay, the *drosophila* Fos homologue) which are known heterodimers of Jra/dJun as well as for Jra/dJun itself are identified in the non-coding region of this set of genes by the *i-cisTarget* method. This suggests that 3 hours after trauma and infection, DH flies maintain an exacerbated stress response compared to SH ones -most probably mediated by JNK pathway- and that control flies, that were subjected to trauma alone, have also mounted a stress response, although delayed compared to DH ones.

Cluster 6 consists of 416 up-regulated genes in the SH group for which the GO enriched terms are 'egg coat formation' ($P = 4.56e^{-7}$), 'transmembrane transport' ($P = 2.41e^{-6}$) and 'immune response' ($P = 0.03$) (Table 1). Genes involved in the formation of protective

coverings of the egg thus appeared to be down-regulated in DH and control flies compared to SH flies. This may highlight a down-regulation of egg laying in response to trauma in DH flies, a (persistent) effect that has already been found after 30 minutes (cluster 3, Table 1). It is interesting to note that expression of innate immune response genes is maintained at higher levels in SH flies compared to DH ones, similarly to what is observed at 30 minutes (cluster 2, Table 1). This includes antimicrobial peptide coding genes such as *Diptericin (Dpt)*, *Diptericin B (DptB)*, *Drosocin (Dro)*, *CecA1*, *CecA2*, *CecC*, *Defensin (Def)* and *Metchnikowin (Mtk)*, as well as the known regulators of the immune response *PGRP-SC1a*, *PGRP-SC1b*, *PGRP-SC2*. The *i-cisTarget* analysis pointed out GATA type TF binding motifs in non-coding region of cluster 6 genes, suggesting the involvement of this TF family in the regulation of immune response as previously reported [Senger *et al.* 2006]. Importantly, a significant proportion of cluster 6 genes were identified as potential transcriptional targets of the CrebA/Creb3-like protein (hypergeometric test; $P = 4.90e^{-13}$) (Table S5), a known regulator of cells secretory capacity [Fox *et al.* 2010]. In addition, although the gene coding for the CrebA TF was not included in the cluster 6, relaxing the stringency of the differential expression analysis by considering genes identified only by EdgeR, pointed out the *CrebA* gene as down-regulated in DH flies compared to SH ones (Table S2). This suggests that infection alone triggers a CrebA mediated up-regulation of secretory pathway and that this process may not be activated upon trauma.

Cluster 7 was composed of 15 genes up-regulated in DH flies which do not exhibit statistically significant GO term enrichment.

Late phase of the early response to trauma and infection :

Finally at 6h, 449 genes were found to be differentially expressed between the three conditions and were partitioned into 3 clusters (Figure 2C).

Cluster 8 is composed of 160 genes down-regulated in SH condition compared to both DH and controls. The GO enrichment analysis revealed the term 'defense response' ($P = 2.27e^{-4}$) suggesting that at 6 hours, genes linked to the innate immune response start to be activated in DH flies. This hypothesis is further supported by *i-cisTarget* analysis which highlighted the Relish binding motif enrichment in the potential regulatory regions of this gene set. Since this cluster comprises genes that are up-regulated in DH flies but also in

control flies that were not subjected to bacterial challenge, this may reflect a fly response to inflammation. The 158 genes forming the cluster 9 are up-regulated in SH condition. Similarly to what was observed at 3 hours (cluster 6), the GO enrichment analysis pointed out the term 'egg coat formation' ($P = 4.05e^{-13}$). Cluster 10, composed of 131 up-regulated genes in both SH and DH flies compared to control alone and which are significantly enriched in GO term associated to process of cell-cell signaling ($P = 7.82e^{-7}$).

Overall, this data mining suggests that flies subjected to both trauma and infection display an immediate activation of stress response genes which is exacerbated compared to that of flies infected only. This analysis also underlines the possible involvement of the JNK pathway in this process. In addition, while the innate immune response appeared to be rapidly mounted in SH flies, it appeared to be delayed in DH flies. This could explain their reduced resistance to infection. Interestingly, in SH flies, genes related to transmembrane transport were actively transcribed and this process might depend on the CrebA TF.

Functional analysis of Jra/dJun and CrebA TFs

To analyse the functional involvement of the JNK and CrebA pathways in the differential susceptibility of DH and SH flies to Pe infection, we inhibited and/or overexpressed the TFs Jra/dJun (the downstream target of JNK pathway) and CrebA, which have been found differentially expressed in DH and SH flies.

The implication of these TFs in the reduced survival of DH flies was tested by genetically manipulating their activity in whole flies using the GeneSwitch system [Osterwalder *et al.* 2001]. Briefly, this system allows the expression of a transgene to be induced by RU486 feeding and therefore permits temporal control of gene expression. We used the Tubulin>GeneSwitch driver in order to drive expression of transgenes in whole individuals. Induction at adulthood allows us to bypass potential secondary effects that may be caused by inhibiting or activating the pathways during embryonic development, larval life or metamorphosis. In addition, the GeneSwitch system enables comparing individuals of the same genetic background. We verified that whatever its concentration (from 20 μg to 200 μg), RU486 alone, without inducing a transgene expression, has no effect on the survival rates of DH, SH and control flies (Figure S2).

We first measured the survival rate of flies subjected to RNA interference mediated inactivation of *Jra/dJun* upon SH and DH challenge as well as in control sham flies. *Jra/dJun* inhibition had no significant effect on survival of control and SH flies, while it almost completely rescued DH flies survival whose rate reached that observed for the SH ones (Figure 3B and Figure S3A- B). This supports *Jra/dJun* involvement in the higher sensibility to Pe infection of DH flies compared to SH ones. This is confirmed by the effect of *Jra/dJun* over-expression, which worsened both SH and DH flies survival (Figure 3D and Figure S3 C- D). Thus, in wounded and infected DH flies, the activation of the JNK pathway is detrimental and appears responsible, at least in part, for their reduced resistance to Pe infection.

We next tested the impact of modulating *CrebA* function using the same GeneSwitch system (Figure 4). We first analyzed the effect of RNAi mediated *CrebA* knock-down. While the decrease of *CrebA* activity had no effect on the survival rate of DH flies (Figure 4B and Figure S4), it had a major impact on the survival of SH ones, which behaved like DH flies. This indicates that *CrebA* has a major function in Pe infected fly survival and suggests that reduced DH fly resistance to infection may be at least in part due to reduced *CrebA* function. The effect observed by inducing *CrebA* over-expression in whole flies supports this view. Indeed, the gain of function of this TF improved the survival rate of both DH and SH flies (Figure 4 D and Figure S4) supporting the idea that *CrebA* plays a main role to fight Pe infection.

dTNF receptor involvement in the response to infection

In flies, the JNK pathway was recently shown to be a downstream target of the eiger/TNF pathway in the control of cell polarity through the activation of its receptor Grindelwald (*Grnd*) [Andersen *et al.* 2015]. Since TNF in vertebrates has a central role in innate immunity and inflammation [Newton *et al.* 2012], we wondered whether its activity may be controlled by the JNK pathway in DH flies. In such a case, modulating the *Grnd* activity may recapitulate the effects of *Jra/dJun* function on DH flies survival. We therefore induced the expression of a truncated form of *Grnd*, *Grnd^{extra}*, which lacks the intracellular part of the receptor and thus cannot induce its downstream effectors. *Grnd^{extra}* competes with endogenous *Grnd* for the binding of the ligand Eiger, leading to a decreased activity of

the endogenous receptor [Andersen *et al.* 2015]. A significant difference in survival rates between SH and DH group of flies was observed ($P < 0.001$) without inducing the GeneSwitch system (Figure 5A), but this difference was abolished upon expression of Grnd^{extra} (Figure 5B). Importantly, Grnd^{extra} expression reduced the survival rate of SH flies but had no effect on that of DH ones (Figure S5 C-D). This result indicates that the reduction of endogenous Grnd activity induces a susceptibility to Pe infection in flies but has no measurable effect on the survival of injured and infected DH flies. This result was confirmed by RNAi mediated inhibition of *Grnd*. Indeed RNAi mediated *Grnd* knock-down also reduced the survival rate of SH flies but not that of DH ones (Figure S6).

We next wondered whether a *Grnd* gain of function may affect the survival of flies in SH and DH conditions. We used the mutant form Grnd^{intra} which lack the extracellular domain of the receptor [Andersen *et al.* 2015] and therefore behaves as a constitutive active form of the receptor. The induction of Grnd^{intra} in whole adult improves the survival of both SH and DH flies (Figure 5C-D and Figure S5).

In conclusion the reduced activity of Grnd induced a susceptibility to an infection, but had no effect on DH phenotype, while its activation improved the survival of both SH and DH groups. We therefore unravel a novel function for *Grnd* in innate immunity in flies. However, because this effect is opposite to that of *Jra/dJun*, it rules out the possibility of JNK pathway induction through dTNFR in this system.

Discussion

We have shown that thorax wounding induces a reduced resistance to bacterial challenge and is accompanied by increased host mortality upon infection. Our results thus confirm the observation made by Chambers *et al* (2015). Moreover, we demonstrate that this susceptibility is proportional to the size of the trauma performed. Importantly, survival rates differences between DH (wounded and infected) and SH (infected) flies were observed in the earlier phase of the experiments (up to 20 hours after trauma and infection).

We investigated the underlying mechanisms of DH flies susceptibility to bacterial infection by comparing the transcriptome landscape of DH, SH, and control flies during the early steps of the process. We observed that the anti-bacterial immune response was rapidly mounted in SH flies but not in DH ones. Conversely, genes with increased expression in DH flies compared to SH ones are significantly enriched for stress related annotations, including heat shock related genes and members of the JNK pathway. Therefore our results point out an interaction between trauma and infection in flies, which culminate in a reduced resistance to infection following trauma and may be mediated by stress pathway related genes.

We further demonstrate that the JNK pathway plays a central role in the DH phenotype. Indeed, members of the pathway were actively transcribed in DH flies, as soon as 30 minutes after treatment, and reduction of *Jra/dJun* activity rescued the increased mortality of DH flies, while its increase worsened the survival of SH ones. This indicates that JNK pathway activation, which was stronger and appeared earlier in DH flies, is instrumental in their reduced resistance to an infection following trauma. Of note, the JNK pathway is involved in both inflammation and infection in numerous model organisms, from flies to mammals. For instance, in flies, signaling through the JNK pathway has been implicated in the transcriptional response to various microbial agents [Boutros *et al.* 2002] and is activated by ROS and required for regeneration that maintain tissue homeostasis following tissue damage [Santabárbara-Ruiz *et al.* 2015]. In human monocytes, JNK pathway activation leads to the production of inflammatory cytokines [Guha *et al.* 2001], whereas it induces cell oxidative damage in human endothelial cells [Li *et al.* 2016]. In DH flies the JNK pathway may be activated independently both by sterile injury and by bacterial infection then leading to

its hyper-activation that could have deleterious effects including inappropriate response to infection.

In flies, the JNK pathway was recently shown to be induced by the *Drosophila* TNF receptor *Grnd* following disruption of epithelial polarity [Andersen *et al.* 2015]. Since the TNF pathway has been repeatedly implicated in mediating sterile inflammation in vertebrates [Kaczmarek *et al.* 2013; Chan *et al.* 2015], we tested its implication in the DH phenotype. Interestingly, we show that *Grnd* activation increased the survival both in SH and DH flies, whereas its reduction decreases the survival of SH flies. Thus, we obtained the opposite of what we expected. This clearly rules out that the *Grnd* receptor is involved in the reduced resistance of DH flies, and indicates the JNK pathway is rather activated by another receptor in the DH flies.

We also provide evidence that *CrebA* is involved in the decreased survival of DH flies. First, the set of over-expressed genes in SH flies at 3 hours was enriched for the *CrebA* TF targets, suggesting that DH condition prevents their activation. Second, we demonstrate that the decrease of *CrebA* activity reduced the survival of SH flies, which became similar to that of DH flies, whereas *CrebA* over-expression improved the survival rate of both DH and SH flies. Interestingly, in mammals, the *CrebA/CrebH* TF is known to be involved in systemic inflammatory response [Zhang *et al.* 2006]. In addition, multiple members of the *CrebA* family have been implicated in signaling pathways downstream inflammation and infection [Newton *et al.* 2012].

Is there any link between the effect of the JNK pathway and that of *CrebA* on DH flies survival? One plausible scenario is that activation of the JNK pathway leads to a reduced *CrebA* expression which in turn impacts on organismal resistance to infection. Importantly it has been shown that the JNK pathway acts upstream of *CrebA*, and regulates its expression in neurons to control neuronal plasticity [Sanyal *et al.* 2002]. Epistasis experiments would be required to experimentally test whether *CrebA* expression is repressed by the JNK pathway in DH flies. Whatsoever the situation, we unravel a novel function for *CrebA* in innate immunity in flies, which, to the best of our knowledge, was not characterized so far. This may prompt further investigations to understand the molecular basis of *CrebA* implication in the fly innate immune system. Of note, *CrebA* was shown to regulate genes of the secretory

pathway [Fox *et al.* 2010] and potential CrebA targets were identified in this study suggesting that CrebA is involved in innate immunity through cell secretion process.

It is important to note that the sterile wounding was inflicted in the thorax and may therefore mainly affect the indirect flight muscles (IFMs). As a matter of facts, muscles are known immune reactive tissues and were demonstrated to provide protection during microbial infection [Chatterjee *et al.* 2016]. Furthermore, it has been shown previously that structural components of muscles are involved in resistance to thoracic septic wounding [Apidianakis *et al.* 2007]. This suggests that muscles *per se* have a central role in the protection against inflammation and infection. Indeed, a recent study demonstrated that thorax injury, but not abdominal one, lowers resistance to infections in flies [Chambers *et al.* 2014], confirming that muscles may have a specific function in the organismal response to sterile inflammation. A central issue, not addressed in the present study, will be to determine the tissue specificity of the unraveled signaling pathways, the muscles constituting the first candidates.

To summarize, our results establish that in flies, like in vertebrates, combined trauma and infection is deleterious for survival. In addition, we demonstrate the role of the JNK pathway and that of CrebA in the reduced survival of the DH flies. Since the signaling pathway unraveled here are conserved between *Drosophila* and mammals, our results may prompt investigating their involvement in either the hyper-inflammatory response or the immunosuppression leading to morbidity and mortality in sepsis patients.

Acknowledgments

We thank A. Gallet and J. Colombani for fly stocks, J Royet for helpful discussions, and the Bloomington stock center for providing fly stocks.

Competing interests

No competing interests declared.

Author contributions

R. R. Performed experiments conceived and designed experiments. Analyzed data. Wrote manuscript

A. C. Performed experiments.

A. D. Conceived and designed experiments

DS: processed and analysed RNAseq data

NF: performed RNAseq.

P. R. contributed to experimental design, supervised statistical analyses, performed data analyses, and corrected the manuscript.

C. N. Initiated the project. Contributed to experimental design and data analysis. Corrected manuscript.

L. R. Conceived and designed experiments. Analyzed data. Contributed reagents and analysis tools. Corrected manuscript

L. P. Conceived and designed experiments. Analyzed data. Contributed reagents and analysis tools. Wrote manuscript. Secured funding.

Fundings

This work was supported by ANR partner of the ERASysBio + initiative supported under the EU ERA-NET Plus scheme in FP7 (LP).

Data availability

RNA-seq data are available under the accession number

References

- Akagi , K., Sarhan, M., Sultan, A. R., Nishida, H., Koie, A., Nakayama, T., et al. (2016). A biological timer in the fat body comprising Blimp-1, β Ftz-f1 and Shade regulates pupation timing in *Drosophila melanogaster*. *Development.*, 143(13):2410-6.
- Andersen, D. S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., et al. (2015). The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature.*, 522(7557):482-6.
- Andersson , U., & Tracey , K. J. (2011). HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.*, 29:139-62.
- Apidianakis , Y., & Rahme , L. G. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat Protoc.*, 4(9):1285-94.
- Apidianakis , Y., Mindrinos, M. N., Xiao, W., Tegos, G. P., Papisov, M. I., Hamblin, M. R., et al. (2007). Involvement of skeletal muscle gene regulatory network in susceptibility to wound infection following trauma. *PLoS One.*, 2(12):e1356.
- Arbouzova , N. I., Bach, E. A., & Zeidler, M. P. (2006). Ken & barbie selectively regulates the expression of a subset of Jak/STAT pathway target genes. *Curr Biol.*, 16(1):80-8.
- Bischoff , V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2004). Function of the *drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.*, 5(11):1175-80.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (2004). The logrank test. *BMJ.*, 328(7447):1073.
- Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., et al. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.*, 306(23):2594-605.
- Boutros, M., Agaisse, H., & Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell.*, 3(5):711-22.
- Chambers, M. C., Jacobson, E., Khalil, S., & Lazzaro, B. P. (2014). Thorax injury lowers resistance to infection in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun.*, 82(10):4380-9.
- Chan, F. K., Luz, N. F., & Moriwaki, K. (2015). Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol.*, 33:79-106.
- Chatterjee , A., Roy, D., Patnaik, E., & Nongthomba, U. (2016). Muscles provide protection during microbial infection by activating innate immune response pathways in *Drosophila* and zebrafish. *Dis Model Mech.*, 9(6):697-705.
- Chen, G. Y., & Nuñez , G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.*, 10(12):826-37.

- Ekengren , S., Tryselius , Y., Dushay, M. S., Liu, G., Steiner, H., & Hultmark, D. (2001). A humoral stress response in *Drosophila*. *Curr Biol.*, 11(9):714-8.
- Fox, R. M., Hanlon, C. D., & Andrew, D. J. (2010). The CrebA/Creb3-like TFs are major and direct regulators of secretory capacity. *J Cell Biol.*, 191(3):479-92.
- Fox, R. M., Hanlon, C. D., & Andrew, D. J. (2010). The CrebA/Creb3-like TFs are major and direct regulators of secretory capacity. *J Cell Biol.*, 191(3):479-92.
- Guha, M., & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.*, 13(2):85-94.
- Imrichová , H., Hulselmans, G., Atak, Z. K., Potier, D., & Aerts, S. (2015). i-cisTarget 2015 update: generalized cis-regulatory enrichment analysis in human, mouse and fly. *Nucleic Acids Res.*, 43(W1):W57-64.
- Kaczmarek , A., Krysko , O., Heyndrickx , L., Løve Aaes, T., Delvaeye , T., Bachert , C., et al. (2013). TNF/TNF-R1 pathway is involved in doxorubicin-induced acute sterile inflammation. *Cell Death Dis.*, 4:e961.
- Kurucz , E., Márkus , R., Zsámboki , J., Folkl-Medzihradzky, K., Darula , Z., Vilmos , P., et al. (2007). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol.*, 17(7):649-54.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.*, 9(4):357-9.
- Lemaitre , B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.*, 86(6):973-83.
- Li, C., Ma, D., Chen, M., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, J., et al. (2016). Ulinastatin attenuates LPS-induced human endothelial cells oxidative damage through suppressing JNK/c-Jun signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, 474(3):572-8.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15(12):550.
- Lyne, R., Smith, R., Rutherford, K., Wakeling, M., Varley, A., Guillier, F., et al. (2007). FlyMine: an integrated database for *Drosophila* and *Anopheles* genomics. *Genome Biol.*, 8(7):R129.
- Monnier , V., Iché-Torres, M., Rera, M., Contremoulins, V., Guichard, C., Lalevée, N., et al. (2012). dJun and Vri/dNFIL3 are major regulators of cardiac aging in *Drosophila*. *PLoS Genet.*, 8(11):e1003081.
- Mulinari, S., Häcker , U., & Castillejo-López, C. (2006). Expression and regulation of Spätzle-processing enzyme in *Drosophila*. *FEBS Lett.*, 580(22):5406-10.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(3). pii: a006049.

- Osterwalder , T., Yoon, K. S., White, B. H., & Keshishian , H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(22):12596-601.
- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M., & Xu, T. (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech.*, 1(2-3):144-54.
- Rialdi , A., Campisi, L., Zhao, N., Lagda, A. C., Pietzsch , C., Ho, J. S., et al. (2016). Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. *Science.*, 352(6289):aad7993.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.*, 26(1):139-40.
- Saeed , A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.*, 34(2):374-8.
- Santabárbara-Ruiz, P., López-Santillán, M., Martínez-Rodríguez, I., Binagui-Casas, A., Pérez, L., Milán, M., et al. (2015). ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration. *PLoS Genet.*, 11(10):e1005595.
- Sanyal, S., Sandstorm, D. J., Hoeffler, C. A., & Ramaswami, M. (2002). AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Nature.*, 416(6883):870-4.
- Senger, K., Harris, K., & Levine, M. (2006). GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(43):15957-62.
- Shaukat , Z., Liu, D., & Gregory, S. (2015). Sterile inflammation in *Drosophila*. *Mediators Inflamm.*, 2015:369286.
- Soukas, A., Cohen, P., Socci, N. D., & Friedman, J. M. (2000). Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.*, 14(8):963-80.
- Stramer, B. M., & Dionne, M. S. (2014). Unraveling tissue repair immune responses in flies. *Semin Immunol.*, 26(4):310-4.
- Stramer, B., Winfield, M., Shaw, T., Millard, T. H., Woolner, S., & Martin, P. (2008). Gene induction following wounding of wild-type versus macrophage-deficient *Drosophila* embryos. *EMBO Rep.*, 9(5):465-71.
- Takeishi , A., Kuranaga , E., Tonoki, E., Misaki, K., Yonemura, S., Kanuka, H., et al. (2013). Homeostatic epithelial renewal in the gut is required for dampening a fatal systemic wound response in *Drosophila*. *Cell Rep.*, 3(3):919-30.
- Wafaisade, Lefering, Bouillon, Sakka, Thamm, Paffrath, et al. (2011). Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: an analysis of 29,829 patients from the Trauma. *Crit Care Med.*, (4):621-8.
- Ward, P. A. (2012). New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol Med.*, 4(12):1234-43.

Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D. T., et al. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 124(3):587-99.

Figures legends

Figure 1: Wounding reduces flies resistance to infection. (A) Effect of trauma on survival rate of wild-type infected flies. Survival of flies subjected to both sterile wounding and infection (red, DH) was severely compromised compared to that of flies subjected to infection only (green, SH) and that of control sham flies subjected to sterile infection only (blue). Mean and standard deviations of survival based on 10 experiments each performed on 40 flies per condition is shown. Time 0 is the time at which trauma and infection were performed. (B) Effect of wounding size on the survival rate of DH flies. Red: DH flies. Yellow: DH flies injured with a small clean needle (small CI). Mean of 2 experiments each performed on 40 flies per condition. The more the wound is large, the more the survival rate is reduced. (C) SH (green), DH (red) and control sham flies were analyzed for bacterial load at 0, 6 and 24 hours post-experiment. For each time point, 3 flies / group were analyzed, and two independent experiments were performed. CFU: Colony Forming Unit. Crude CFU was adjusted at 6 and 24 hours by dividing CFU at these times by CFU at 0 hour. Thus, the adjusted CFU was fixed at 1 for time 0. Means and standard deviations of the adjusted CFU are shown. While bacterial load was controlled in SH flies from 6h onward, it exponentially rose in DH flies. Of note, sterile wounding did not lead to bacterial infection (data not shown). Statistical analyses have been done using the Log Rank test method (***) $P < 0.001$.

Figure 2: Expression profiling of SH, DH and control flies. Expression profiles of genes whose transcripts levels changed significantly between SH, DH and control at either 30 minutes (A), 3h (B) or 6 h (C). Top: each row represents a single gene ((A) 645 genes, (B) 786 genes and (C) 450 genes). Columns represent the 3 different conditions: control, SH and DH. Clustering has been done using the method of Kmeans. Normalized log₂ expression values were color coded according to the legend at the top. Bottom: expression profiles specific for each cluster. Each curve represents the average expression of the genes within the corresponding cluster. Error bars indicate standard deviations of average expression.

Figure 3: Impact of *jra/dJun* modulation of expression on survival of SH and DH flies. Sterile wounding and/or Pe infection were performed on 1 week adult females of Tubulin>GeneSwitch /+; UAS-*dJun*^{RNAi}/+ (*jra/dJun* RNAi, A, B) and Tubulin>GeneSwitch /+ ; UAS-*jra* /+ (*jra/dJun* over-expression) genotypes in the absence (A, C: not induced) or in the presence (B, D: induced) of RU486 at indicated concentrations. Fly survival was surveyed up to 50 hours after treatments. (A, B) *jra/dJun* inhibition improved the survival of DH flies but did not impact that of SH ones (see also Figure S3 A, B). (C, D): *jra/dJun* over-expression was deleterious for both DH and SH flies (see also Figure S3 C-D). Each group consisted of 120 flies observed among 3 different experiments (40 flies/ group/ experiment). Statistical analyses were performed using the Log Rank test method (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Means of survival are shown, and error bars represent standard deviations.

Figure 4: Impact of the modulation of *CrebA* expression on survival of SH and DH flies. Sterile wounding and/or Pe infection were performed on 1 week adult females of Tubulin>GeneSwitch /+; UAS-*CrebA*^{RNAi}/+ (*CrebA* RNAi, A, B) and Tubulin>GeneSwitch /+; UAS-*CrebA* /+ (*CrebA* over-expression) genotypes in the absence (A, C: not induced) or in the presence (B, D: induced) of RU486 at indicated concentrations. Fly survival was observed up to 50 hours after treatment. (A, B) *CrebA* inhibition worsened the survival of SH flies but did not impact that of DH ones (see Figure S4 A-B). (C, D): *CrebA* over-expression improved both DH and SH flies survival (see Figure S4 C-D). Each group consisted of 120 flies observed among 3 different experiments (40 flies/ group/ experiment). Statistical analyses were performed using the Log Rank test method (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Means of survival are shown, and error bars represent standard deviations.

Figure 5: Impact of Grnd activity modulation on survival of SH and DH flies. Sterile wounding and/or Pe infection were performed on 1 week adult females of Tubulin>GeneSwitch /+; UAS-Grnd^{Extra}/+ (Grnd^{extra}; A, B) and Tubulin>GeneSwitch /+; UAS-Grnd^{Intra} /+ (Grnd^{intra}; C, D) genotypes in the absence (A, C: not induced) or in the presence (B, D: induced) of RU486 at indicated concentrations. Fly survival was observed up to 50 hours after treatment. While Grnd^{Intra} improved both SH and DH survival, Grnd^{extra} worsened

the survival of SH flies but had no impact on DH ones (see Figure S5). Each group consisted of 80 flies observed among 2 different experiments (40 flies / group / experiment). Statistical analyses were performed using the Log Rank test method (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Means of survival are shown, and error bars represent standard deviations.

Table 1: Functional annotation enrichments for gene clusters. Gene clusters described Figure 2 were analysed for GO term enrichment (GO terms) using flymine online database (<http://www.flymine.org/>). Significant P values (cutoff 0.05) are indicated (see Table S3 for details) and the number of genes associated to corresponding GO terms are displayed (Nb genes/GO Term). TF-binding motifs enriched in non-coding regions of gene clusters were identified using i-cisTarget (<https://gbiomed.kuleuven.be/apps/lcb/i-cisTarget/>). The predicted corresponding TF and the NES score of the most representative motifs (cut off 5) are indicated (see Table S4 for details).

Supplementary data :

Figure S1: **Absence of impact of trauma on the survival of flies pricked with an inactivated Pe.** Graph represents the survival rates of control sham (circles), SH (lozenges) and DH (squares) flies. Before performing the infection event, bacteria were heated for 30 min at 95°C. Dead bacteria did not significantly affect flies survival rates, and sterile wounding did not compromise their survival rates either.

Figure S2: **Mifepristone (RU486) does not affect the survival rate of SH, DH and control flies.** Sterile wounding or/and Pe infection were performed on Tubulin>GeneSwitch /+ 1 week adult females in absence (A) or in presence (B) of RU486 at indicated concentrations. Survival rates were determined up to 50 hours after treatment. (C, D) Same experiments as in (A, B): (C) Survival rates of SH flies submitted (triangles) or not (lozenges) to RU486 feeding. $P = 0.82$; (D) Survival rates of DH flies submitted (circles) or not (squares) to RU486 feeding. $P = 0.93$. Each graph represents the observation of 80 flies among 2 different experiments (40 flies/ group/experiment). Statistical analyses were performed using the Log Rank test method ($*** P < 0.001$). Means of survival are shown, and error bars represent standard deviations.

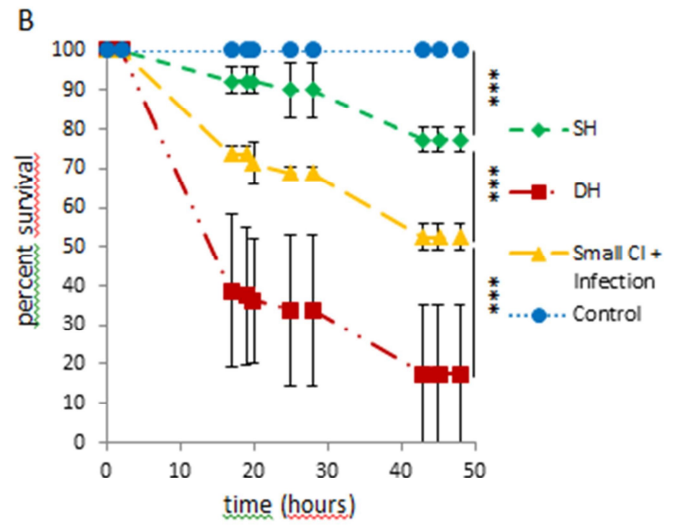
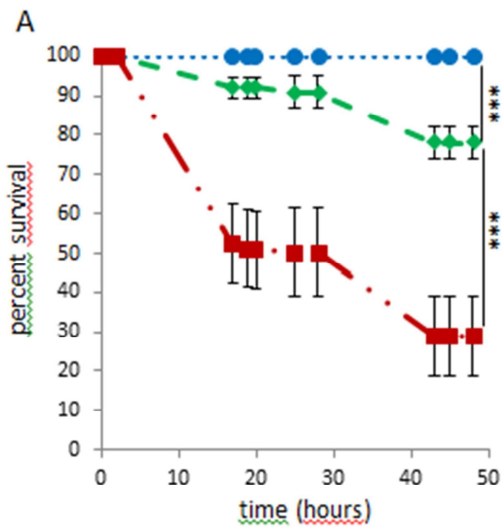
Figure S3: **Comparison of survival rates of SH (A, C) and DH (B, D) flies upon *jra/dJun* loss and gain of function.** Same experiments as in Figure 3. (A, B) Survival rates of SH (A) and DH (B) flies submitted (SH: triangles; DH: circles) or not (SH: lozenges; DH: squares) to *jra/dJun* RNAi mediated inhibition. *jra/dJun* loss of function did not affect the survival of SH flies (A, $P = 0.49$) but improved that of DH flies (B; $P = 0.03$). (C, D) Survival rates of SH (C) and DH (D) flies submitted (SH: triangles; DH: circles) or not (SH: lozenges; DH: squares) to *jra/dJun* over-expression. *jra/dJun* gain of function worsened the survival of both SH flies ($P = 0.0036$) and DH ones ($P = 0.0057$). Each group consisted of 120 flies observed among 3 different experiments (40 flies/ group /experiment). P values were calculated using the Log Rank test

method (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Means of survival are shown, and error bars represent the standard deviation.

Figure S4: Comparison of survival rates of SH and DH flies upon *CrebA* loss and gain of function. Same experiments as in Figure 4. (A, B) Survival rates of SH (A) and DH (B) flies submitted (SH: triangles; DH: circles) or not (SH: lozenges; DH: squares) to RNAi mediated *CrebA* loss-of-function. *CrebA* loss of function worsened the survival of SH flies ($P = 0.0072$) but did not impact the survival of DH flies ($P = 0.89$). (C, D) Survival rates of SH (C) and DH (D) flies submitted (SH: triangles; DH: circles) or not (SH: lozenges ; DH: squares) to a *CrebA* over-expression. *CrebA* gain of function improved the survival of both SH and DH flies ($P = 0.0053$ and $P = 0.0022$ respectively). Each group consisted of 120 flies observed among 3 different experiments (40 flies / group / experiment). P values were calculated using the Log Rank test method (** $P < 0.01$). Means of survival are shown, and error bars represent the standard deviation.

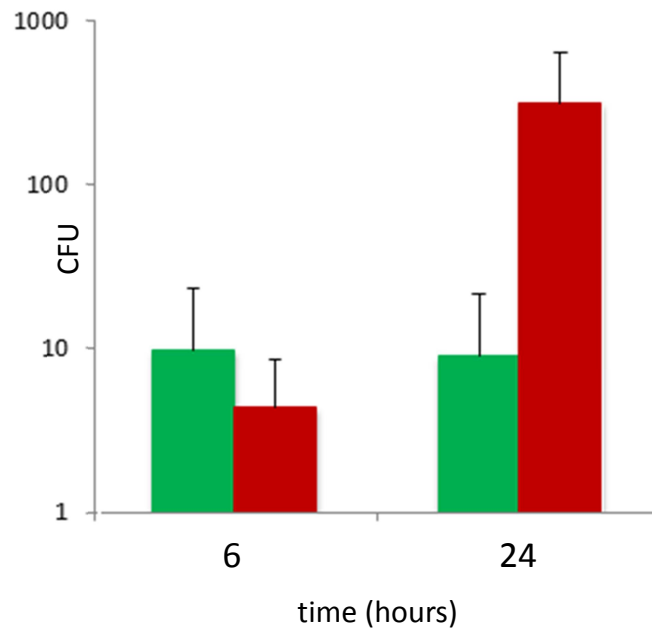
Figure S5: Comparison of survival rates of SH and DH flies upon *Grnd*/TNFR constitutive activation and inhibition (C, D). Same experiments as in Figure 5. (A, B) Survival rates of SH (A) and DH (B) flies expressing (SH: triangles ; DH: circles) or not (SH: lozenges ; DH: squares) a constitutively activated *Grnd* variant. *Grnd* gain-of-function improved both the survival of SH flies ($P = 0.0067$) and DH flies ($P = 0.0028$). (C, D) Survival rates of SH (C) and DH (D) flies expressing (SH: triangles ; DH: circles) or not (SH: lozenges ; DH: squares) a dominant negative form of *Grnd*. *Grnd* inhibition worsened the survival of SH flies ($P = 0.00084$) but did not impact the survival of DH flies ($P = 0.92$). Each group consisted of 80 flies observed among 2 different experiments (40 flies / group / experiment). P values were calculated using the Log Rank test method (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Means of survival are shown, and error bars represent the standard deviation.

Figure S6: **Impact of *grnd* loss-of-function on survival of SH and DH flies.** Sterile wounding and Pe infection were performed on Tubulin>GeneSwitch/+; UAS-*grnd*^{RNAi} (*grnd*^{RNAi}) 1 week adult females in the absence (A) or in the presence (B) of RU486 at indicated concentration. Fly survival was observed up to 50 hours after treatment. *grnd* loss-of-function worsened the survival of SH flies but did not impact that of DH ones. (C, D) Same experiments as in (A, B). Survival rates of SH (C, $P = 0.00077$) and DH (D, $P = 0.94$) flies submitted (SH: triangles; DH: circles) or not (SH: lozenges; DH: squares) to *grnd* RNAi mediated inhibition. Each group is represented by 80 flies observed among 2 different experiments (40 flies/ group/ experiment). P value were calculated using the Log Rank test method (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). Error bars represent the standard deviation.



C

Adjusted CFU



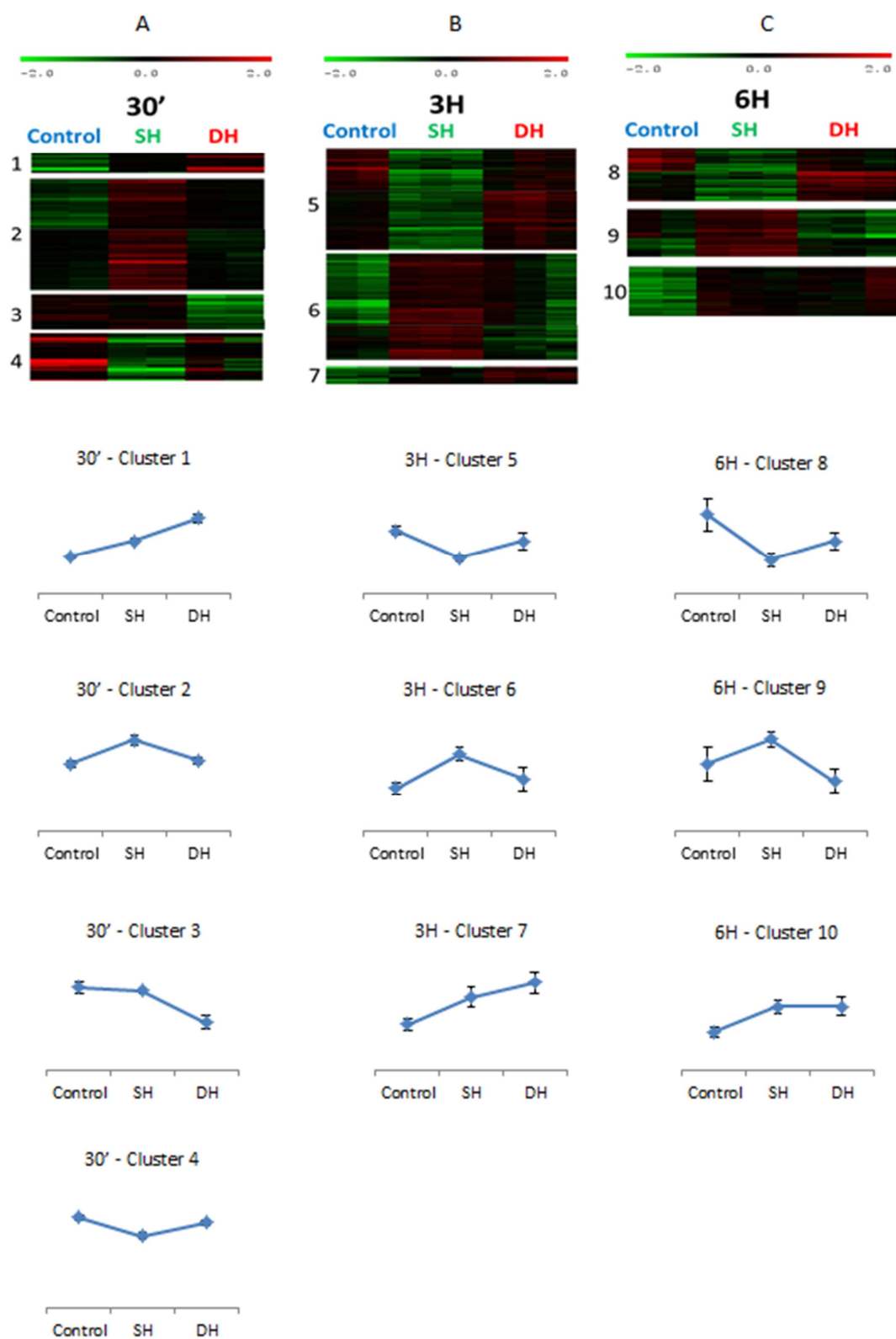
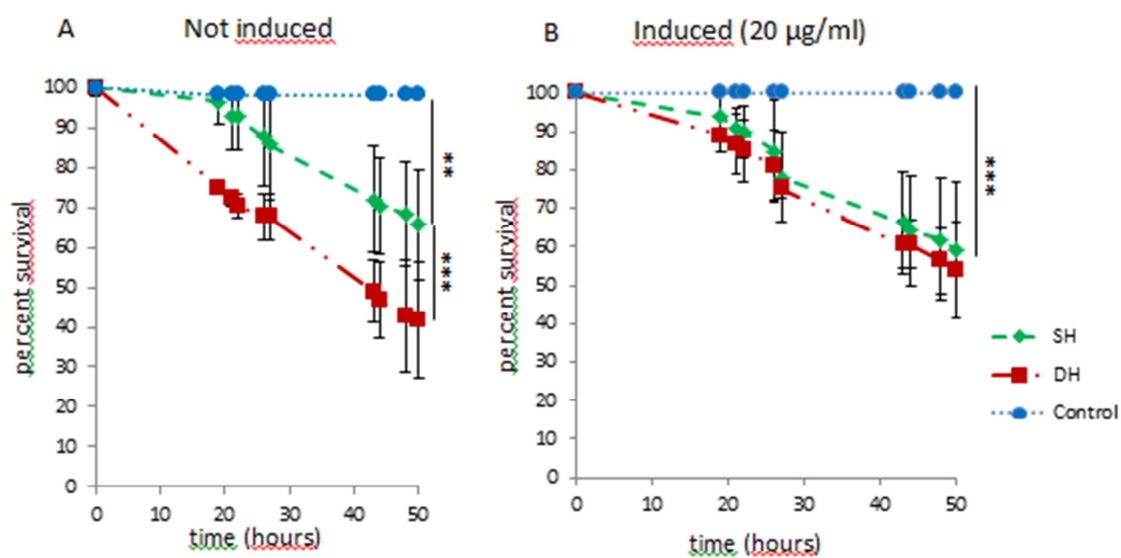


Figure 2

jra/dJun RNAi



jra/dJun over expression

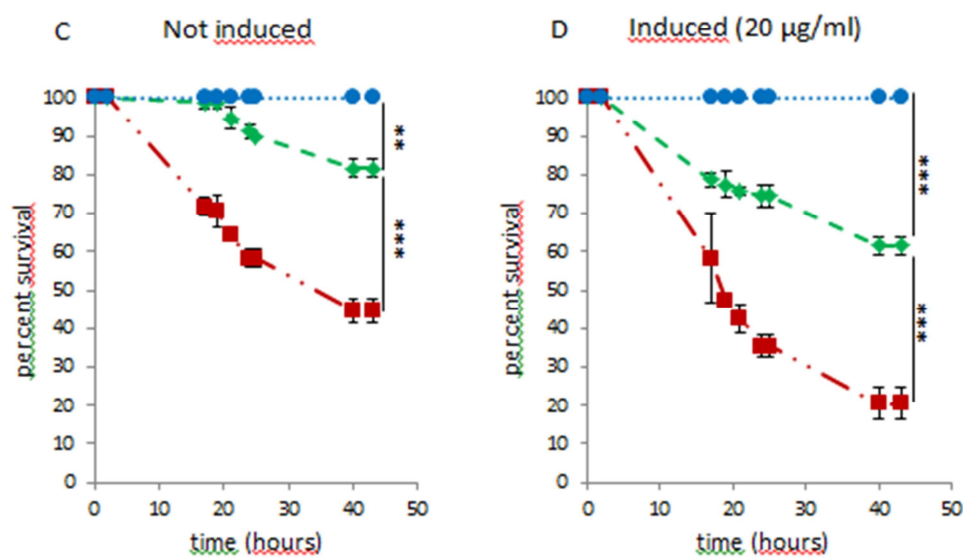
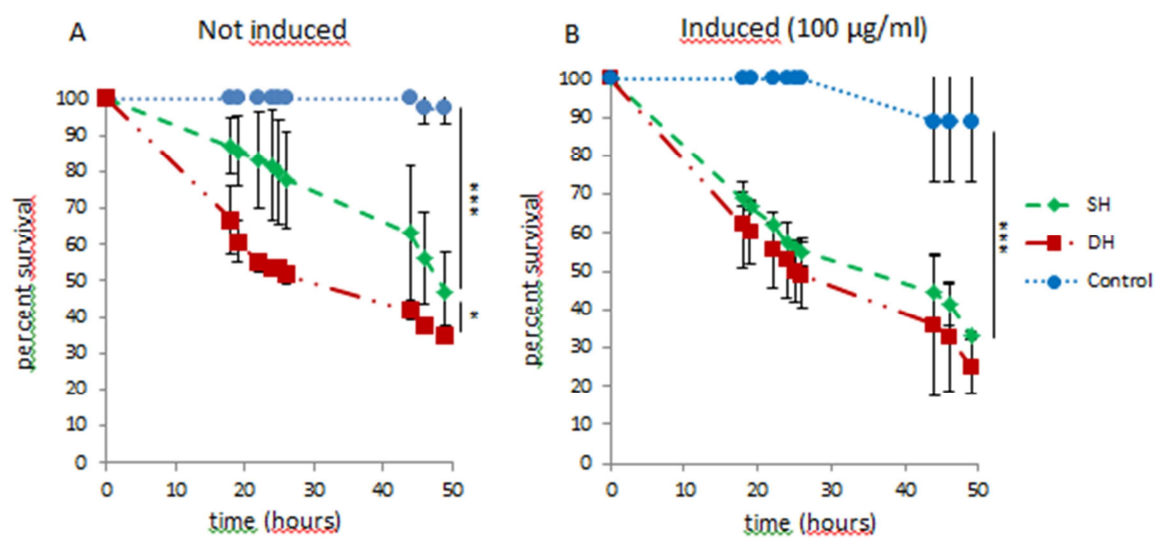


Figure 3

CrebA RNAi



CrebA overexpression

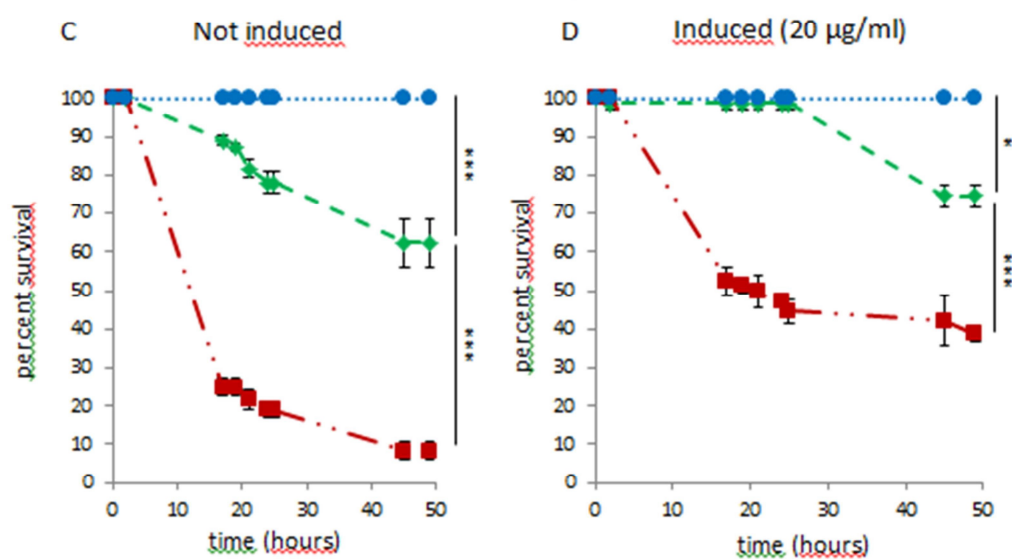


Figure 4

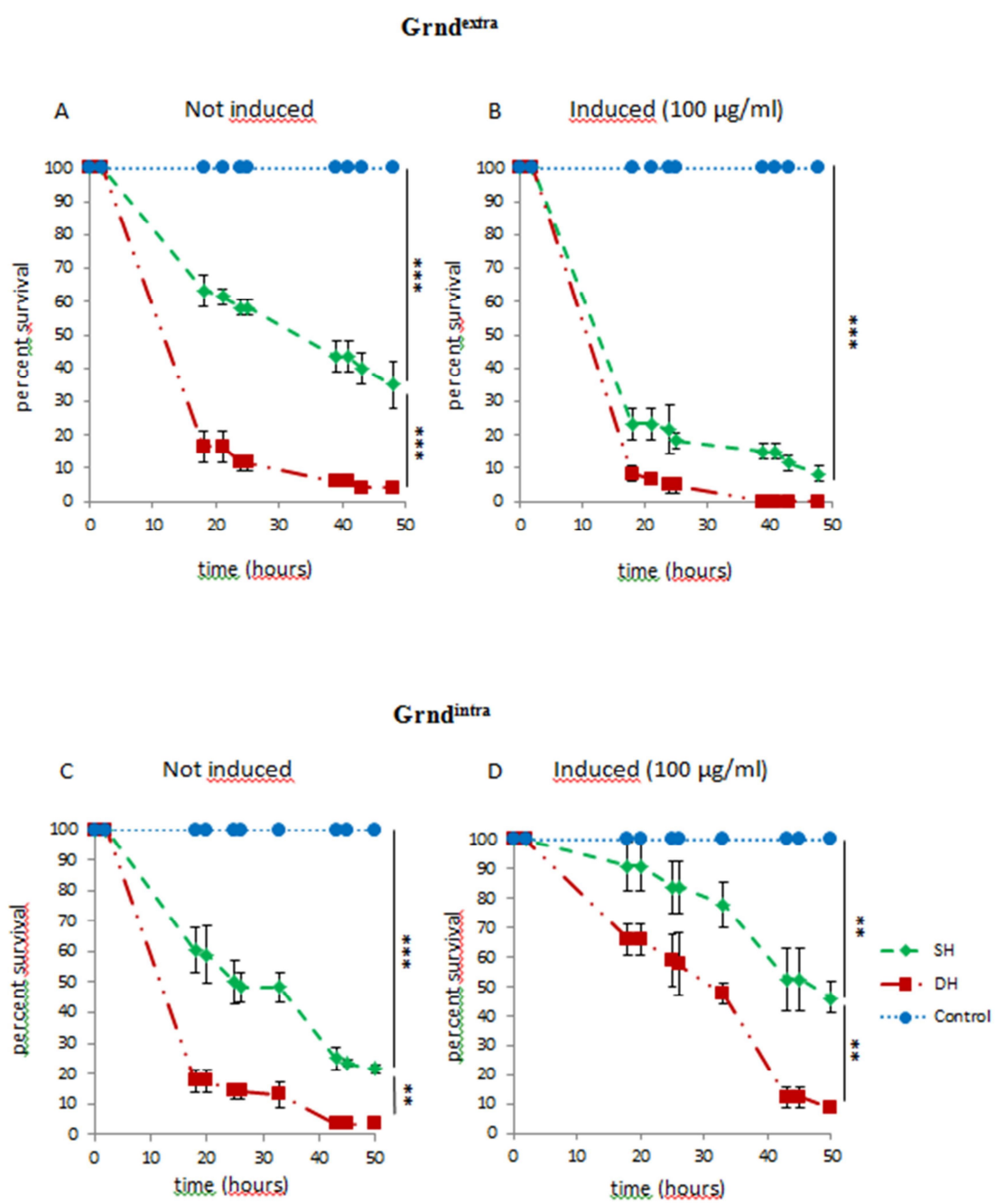
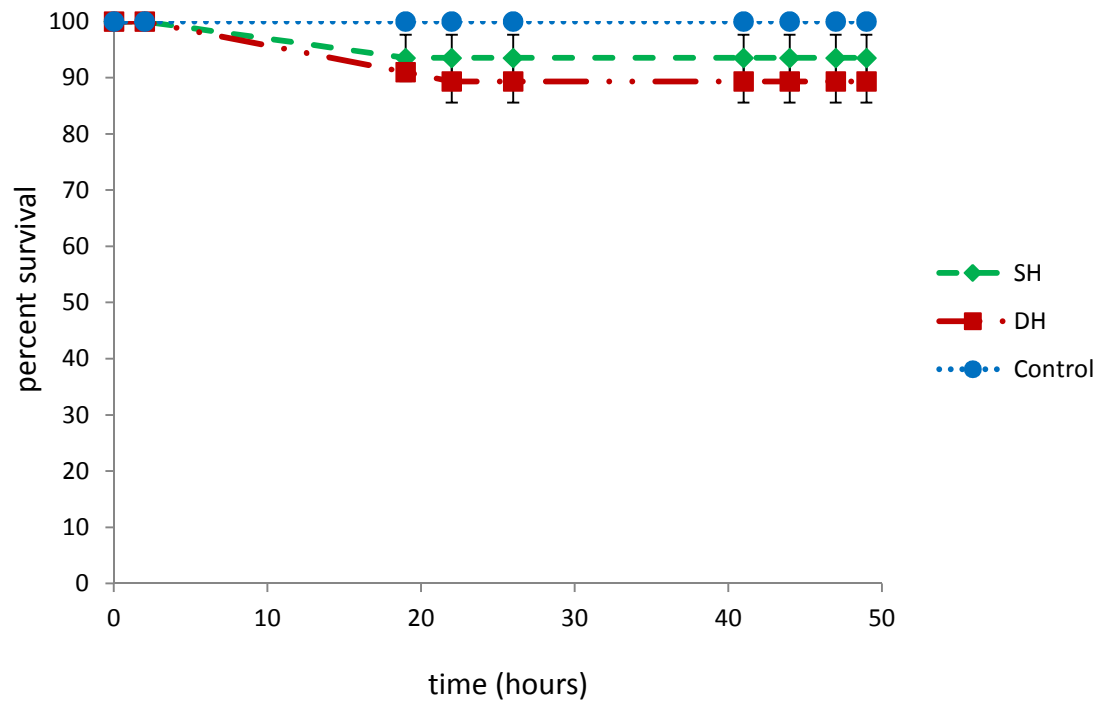


Figure 5

# Cluster	Timepoint	Nb Genes / Cluster	GO Terms (P.val)	Nb Genes / GO Term	TF predicted (NES score)
1	30'	54	Response to stress [GO:0006950] (2.10e ⁻⁴)	18	Tbp (10.7) Hsf (8.6)
2	30'	360	Antibacterial humoral response [GO:0019731] (2.79e ⁻⁴)	12	-
3	30'	84	Eggshell formation [GO:0030703] (1e ⁻⁷) Multi-organism process [GO:0051704] (1.9e ⁻⁴)	12 26	Tbp (7.5) Taf1 (7.5) Di (5.8)
4	30'	147	Tissue development [GO:0009888] (0.03)	29	Ken (9.7) Blimp-1 (8.8) Hsf (6.2)
5	3H	355	Response to stress [GO:0006950] (0.02)	52	Atf3 (5.1) Kay (6.4) Ira (6.4)
6	3H	416	Egg coat formation [GO:0035803] (4.56e ⁻⁷) Transmembrane transport [GO:0055085] (2.41e ⁻⁴) Immune response [GO:0006955] (0.03)	9 39 26	Pnr (8.6) GATAe (8.5) Srp (7.5) Grn (7.0)
7	3H	15	-	-	-
8	6H	160	Defense response [GO:0006952] (2.27e ⁻⁴)	19	Tbp (6.3) Rel (6.3)
9	6H	158	Egg coat formation [GO:0035803] (4.05e ⁻⁸)	10	-
10	6H	131	Cell-cell signaling [GO:0007267] (7.82e ⁻⁷)	25	-

Table 1



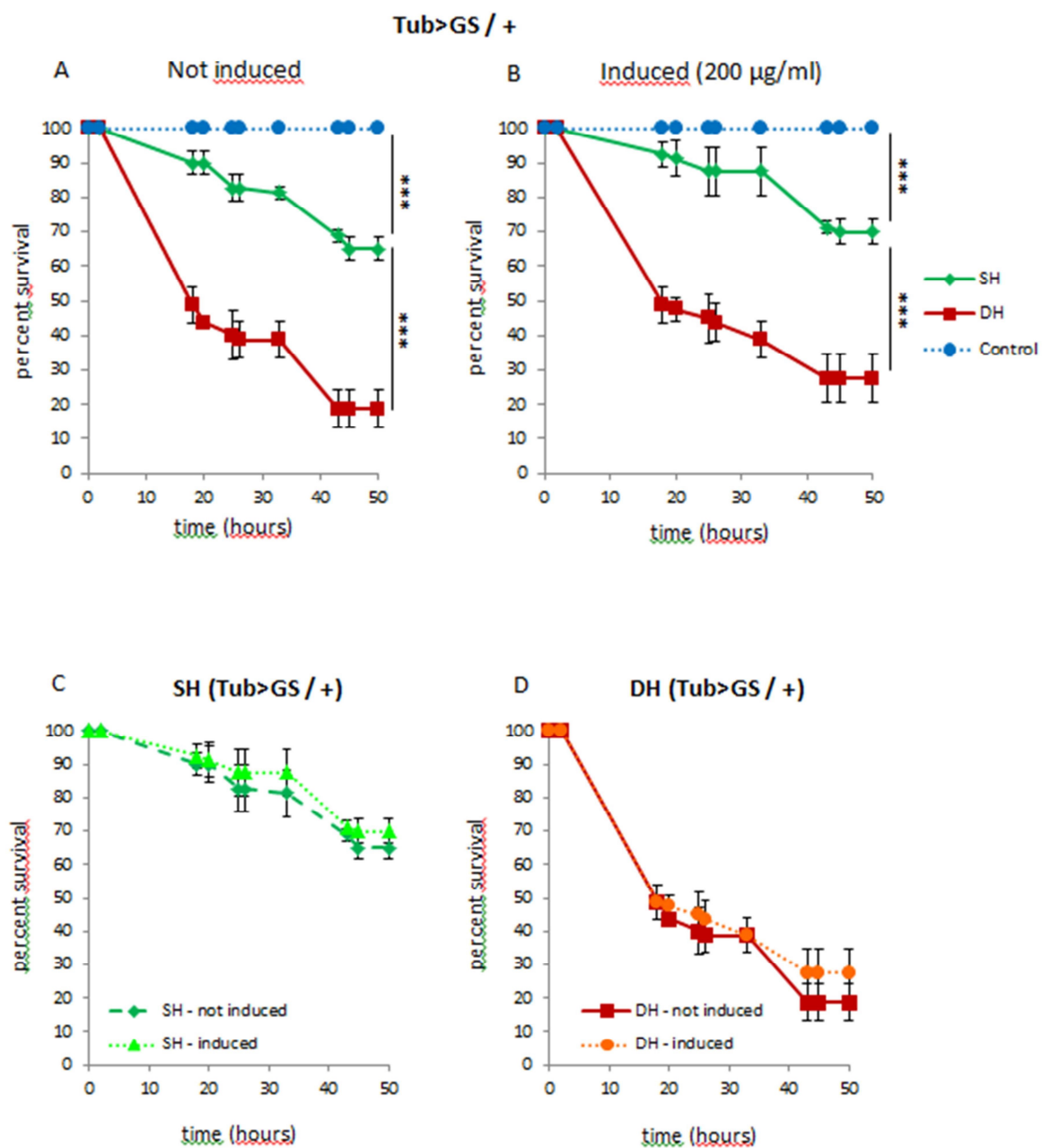


Figure S2

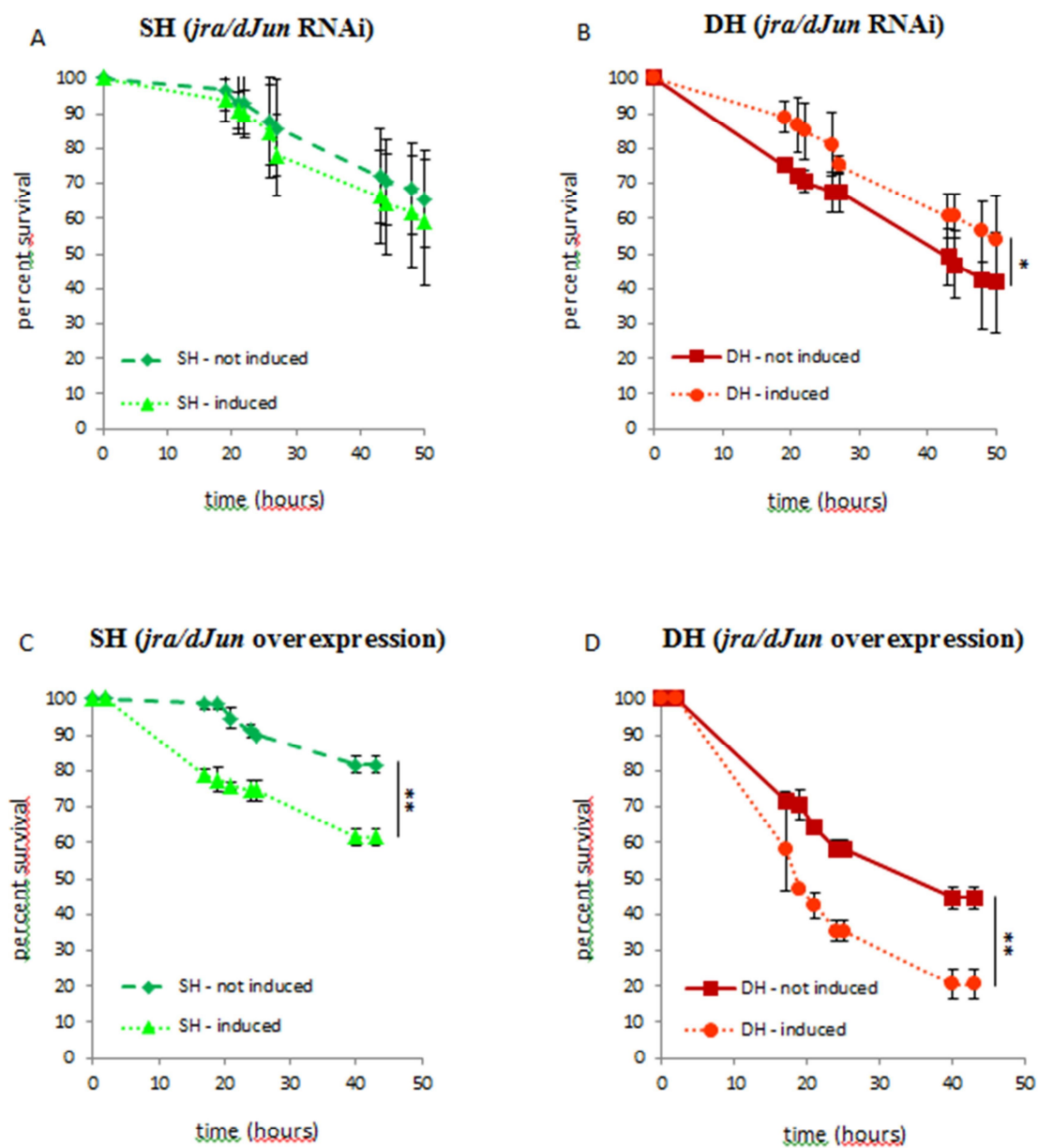


Figure S3

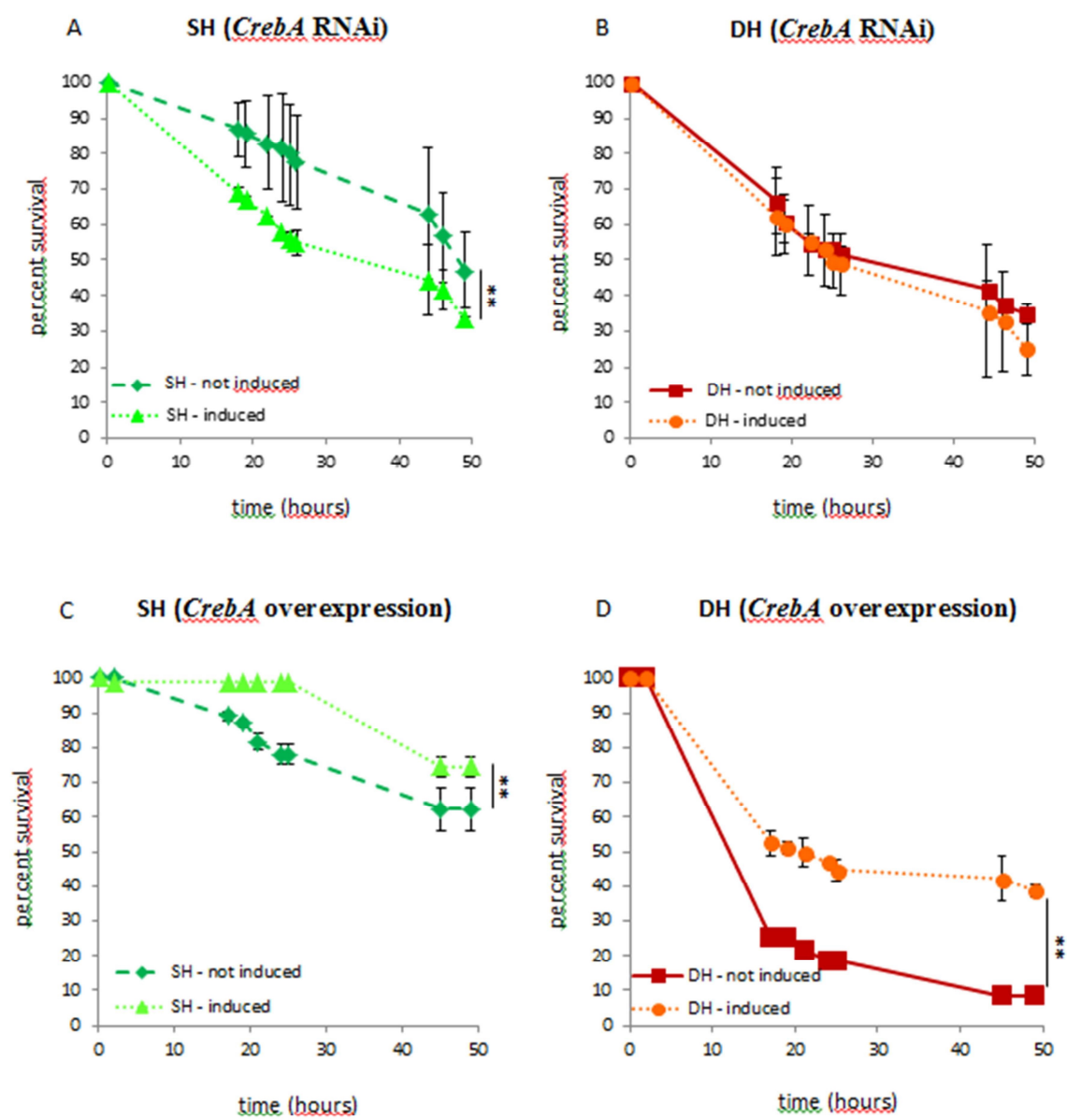


Figure S4

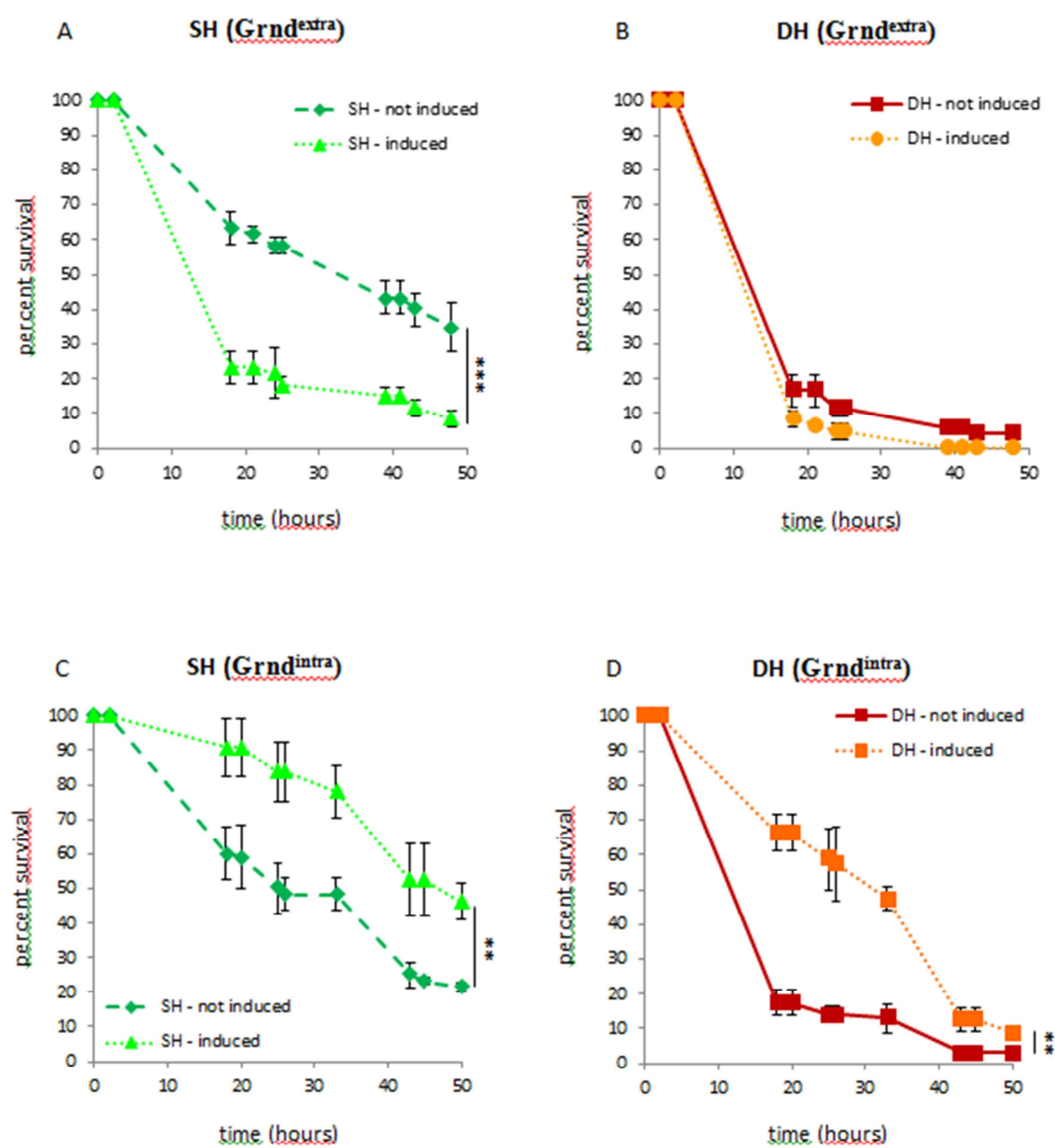


Figure S5

grnd RNAi

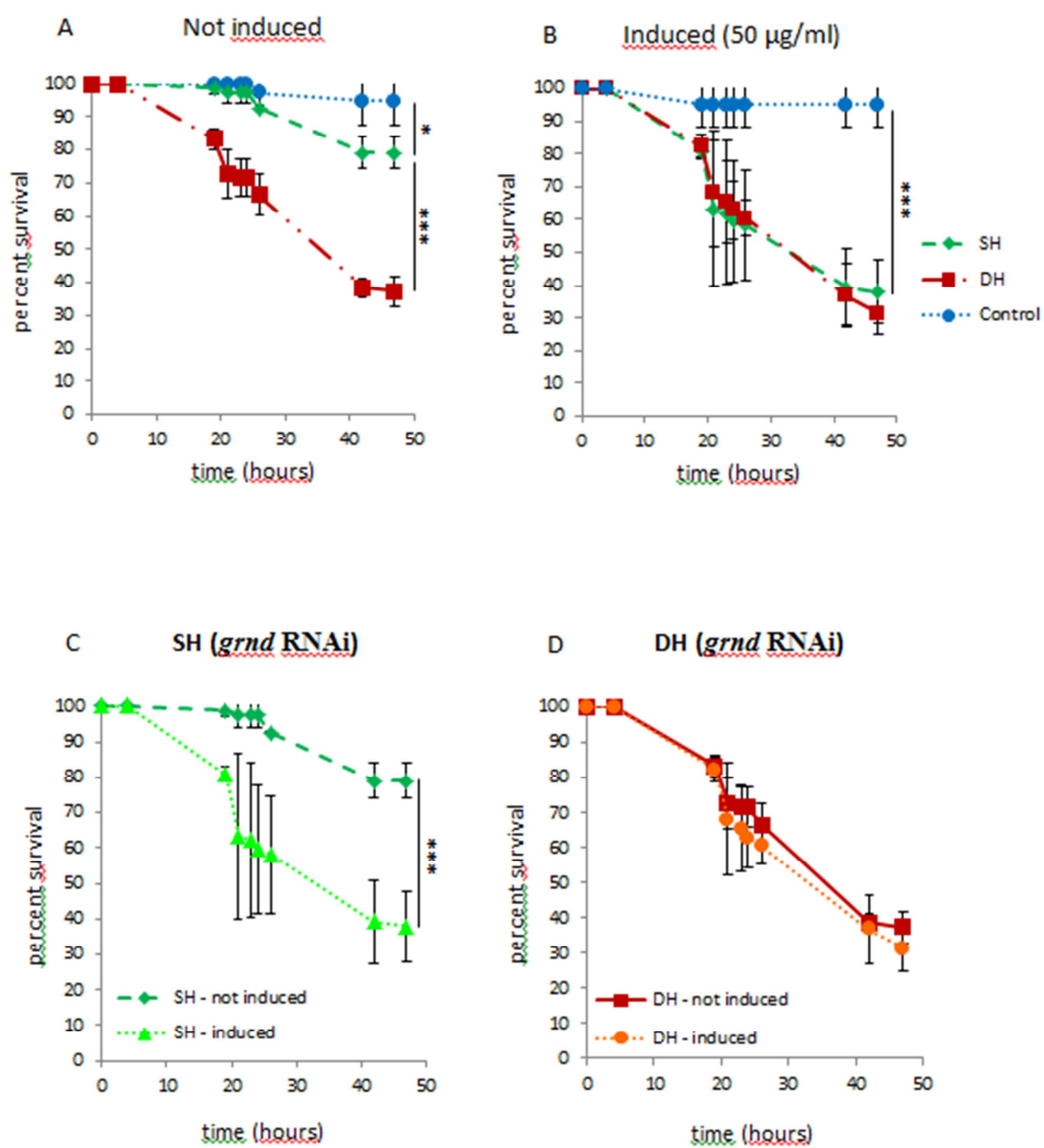


Figure S6

Discussions et perspectives

Les infections post-traumatiques restent aujourd'hui l'une des premières causes de mortalité dans le monde. L'inflammation excessive sous-jacente aux blessures altère la réponse du système immunitaire et prédispose les patients à une réponse inappropriée aux infections opportunistes. Cette dérégulation entraîne un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) qui, associé à une infection, entraîne l'apparition du sepsis pouvant évoluer vers de lourds dommages des organes menant souvent à la mort.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'interaction inflammation/infection, qui est au cœur du syndrome du sepsis. Mon propos a été d'établir un modèle d'étude dans un modèle animal où les événements infectieux et inflammatoires puissent être contrôlés le plus précisément possible. Mon but a été d'étudier les processus biologiques sous-jacents à la susceptibilité à une infection dans un organisme en état inflammatoire activé. L'immunité innée étant la première ligne de défense qui coordonne les réponses à la blessure et à l'infection, c'est à cette partie du système que je me suis intéressé. Cette immunité innée étant conservée chez la drosophile, j'ai établi mon modèle d'étude dans cet organisme modèle. En effet, les travaux de Lemaitre et al. chez la drosophile en 1996 ont permis l'identification des récepteurs TLRs (voir introduction de la thèse) et d'autres voies centrales dans la réponse à l'infection chez les mammifères [Lemaitre *et al.* 1996]. La drosophile est aussi un organisme capable d'activer une réponse inflammatoire face à une blessure stérile, qui se traduit notamment par le recrutement de cellules immunitaires circulantes dans l'hémolymphe capables de phagocyter les débris cellulaires [Pastor-Pareja *et al.* 2008] et l'activation d'une réponse immunitaire humorale menant à une production d'AMPs [Stramer *et al.* 2008].

Notre modèle d'étude consiste à induire une blessure aseptique (Inflammation) sur le thorax (drosophiles femelles âgées de 7 à 10 jours) et, dans les 5 minutes qui suivent, induire une infection, par piqure également mais avec une minutie de diamètre plus petit, avec la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas entomophila*. J'ai choisi de mettre en place mon modèle avec cette bactérie car, au commencement de ma thèse, un membre de l'équipe de Laurent Perrin et Laurence Röder au laboratoire, Arnaud Defaye, avait déjà travaillé en thèse sur cette bactérie et pouvait donc me former quant à la culture de cette bactérie et son utilisation. De plus c'est une bactérie très étudiée chez la drosophile et la perspective d'un crible des lignées DGRP (Drosophila Genetic Reference Panel), réalisé par Bou Sleiman et al.

et publié maintenant [Bou Sleiman *et al.* 2015], avec *Pseudomonas entomophila* m'a incité à la choisir pour mon étude. Cette expérience dite de « double-hit » révèle que des mouches blessées sont moins résistantes à l'infection que celles n'ayant pas reçu de blessure, ce qui suggère que, chez la drosophile aussi, la capacité à se défendre face à un pathogène peut être altérée par l'existence d'un état inflammatoire préexistant.

Une des questions était de savoir si les mouches DH mourraient réellement de cette interaction entre les processus de l'inflammation et ceux de l'infection. En d'autres termes, le fait de piquer les drosophiles sur le thorax avec des minuties de gros diamètre entraine-t-il une fuite d'hémolymphe qui serait dramatique pour la survie de l'insecte ? Tout d'abord, il est important de savoir que les drosophiles mortes dans les 2 heures post-infection ne sont pas prises en compte dans l'étude. Le fait que les mouches contrôle de mon modèle, qui ont reçu 2 piqûres aseptiques, ne souffrent d'aucune mortalité et ce pour toutes les lignées utilisées lors de cette étude représente un argument fort et indique aussi que même le fond génétique des mouches utilisées lors de notre étude n'a pas d'impact sur cette observation. Par ailleurs, 2 heures après les avoir piquées, je pouvais clairement voir la présence d'une cicatrice au site de blessure, indiquant que le trou créé par la blessure ne représente plus ni une porte d'entrée pour d'autres microorganismes, ni une porte de sortie permettant la fuite d'hémolymphe (Figure 26). Néanmoins, j'ai essayé d'utiliser une autre méthode pour induire une réponse inflammatoire chez la drosophile mais sans créer de trou dans l'animal. Pour cela je me suis inspiré de l'étude réalisée par Katzenberger *et al.* En effet en 2015, ces chercheurs ont mis en place un modèle d'étude des lésions cérébrales en infligeant à des drosophiles adultes, âgées de 1 à 4 jours, un impact à grande vitesse, assimilable à un choc engendrant un trauma [Katzenberger *et al.* 2015]. Techniquement, les drosophiles sont placées dans un tube vide qui est relié à un ressort fixé à une de ses extrémités à une plaque de bois. La manipulation consiste à tendre le ressort à 90° par rapport à la plaque de bois à laquelle il est fixé, puis à le relâcher, ce qui a pour conséquence de le ramener à sa position initiale à grande vitesse, engendrant un choc pour les drosophiles qui sont à l'intérieur du tube.



Figure 26: Visualisation de la cicatrisation des mouches DH. Cette photo montre la cicatrice consécutive à la blessure pour les mouches DH. Celles-ci sont pointées par les flèches noires. L'observation est réalisée 2 heures post-infection.

J'ai donc voulu employer cette technique pour induire la réponse inflammatoire au sein des drosophiles. Nous avons donc commandé un ressort ayant les mêmes caractéristiques que celui utilisé dans l'étude mentionnée plus haut et j'ai fabriqué ce que les auteurs ont appelé le « High Impact Trauma device » (HIT device, Figure 27A). J'ai utilisé un tube vide dans lequel j'ai placé 10 mouches (drosophiles femelles âgées de 7 à 10 jours) à la fois et j'ai réalisé l'impact. Dans les 10 minutes qui suivent, j'ai induit l'infection des drosophiles par pique avec *Pseudomonas entomophila*, et j'ai suivi leurs survies. Une seule des 3 expériences que j'ai réalisées montrait une différence de survie significative entre les mouches choquées et infectées et celles n'ayant reçu que la pique infectieuse (Figure 27B). Il a donc été difficile de reproduire les résultats observés.

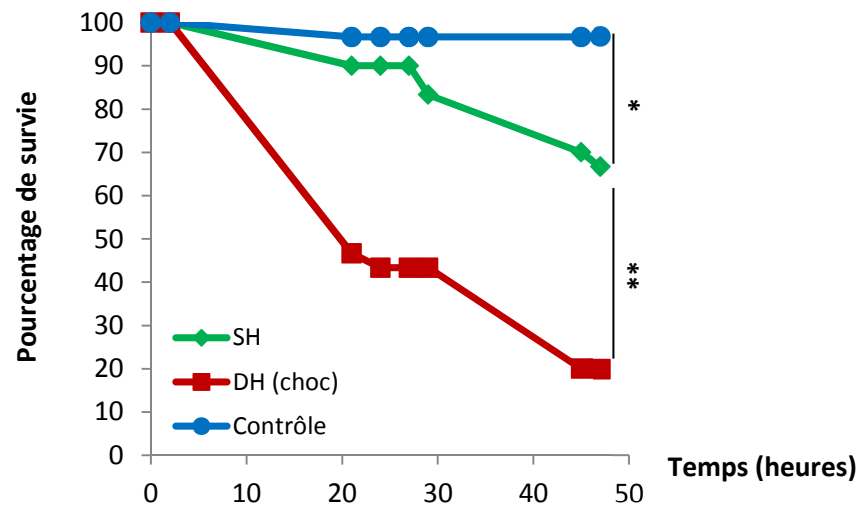
A**B**

Figure 27: Le « Hit device » (A). Nous avons fixé un ressort parallèlement à un support en bois. Les drosophiles sont placées dans le tube à l'extrémité du ressort (indiqué par une flèche rouge). Le ressort est relevé à 75° par rapport à la planche de bois puis relâché, engendrant un choc assimilable à un trauma pour les drosophiles. Celles-ci sont infectées par piqure sur le thorax à dix minutes d'intervalle (DH (choc)) ou, à la place, reçoivent une piqure aseptique (Contrôle). B) Courbes de survie. En ordonnée est représenté le pourcentage de survie et en abscisse, le temps en heure. On constate une différence de survie significative entre les mouches ($P < 0.01$) mais cette méthode souffre d'un problème de reproductibilité. Chacun des groupes représentent 40 drosophiles analysées. Les analyses statistiques ont été calculés en utilisant la méthode du Log Rank test (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Une des raisons pour lesquelles il est difficile d'assurer une reproductibilité par cette méthode est que les drosophiles ne reçoivent pas toutes le même choc au sein du tube. Il doit donc exister une variabilité dans la réponse inflammatoire induite par ce système. Et il est donc probable que cette variabilité de la réponse inflammatoire des drosophiles masque un effet néanmoins réel.

Il a été intéressant de voir que nos résultats sont en accords avec ceux de Chambers et al. Cette équipe a montré en 2014 qu'une blessure sur le thorax de drosophiles adultes

induit une susceptibilité accrue à une infection avec la bactérie à Gram-négatif *Providencia rettgeri* [Chambers *et al.* 2014]. Un premier résultat intéressant dans notre étude a été d'observer que la différence de survie existante entre les mouches DH et SH n'existe que si l'infection est induite dans les minutes qui suivent la blessure. En effet, j'ai réalisé des expériences de « double-hit » en induisant l'infection dans les minutes qui suivent la blessure mais également 1 heure, 3 heures et 6 heures suite à la blessure et la différence n'est significative que quand l'infection suit immédiatement la blessure. Ce résultat est quelque peu contradictoire aux résultats observés par Chambers *et al.* En effet, ils observent une différence significative entre les survies et ce même si l'induction de la blessure est réalisée un jour avant ou après que les drosophiles soient infectées. Néanmoins cette différence est décrite comme étant considérablement moindre que celle observée lorsque les inductions de la blessure et de l'infection sont réalisées à quelques minutes d'intervalles. Dans mon étude, je montre en outre que cette susceptibilité est dépendante de la taille de la blessure puisque en utilisant une minutie de plus petite taille pour induire la blessure, j'ai observé une meilleure survie des drosophiles DH. De manière intéressante, nous avons noté que l'écart de survie se crée dans les 20 premières heures d'observation, puis passé ce délai, les survies des drosophiles DH et SH deviennent comparable. L'hypothèse que nous pouvons faire est que la blessure induit une susceptibilité à l'infection qui se traduit par une baisse de la survie des mouches DH, mais que cette susceptibilité n'existe plus une fois que l'infection est stabilisée. Au regard de la mesure des charges bactériennes, les mouches SH semblent contenir l'agent pathogène à partir de 6H post-infection. Les mouches DH, quant à elles, voient leur charge bactérienne augmenter de manière exponentielle jusqu'à 24 heures d'observation, dernier point auquel nous l'avons mesuré. Les survies des mouches SH et DH devenant comparable à partir de ce point temporel, il serait intéressant de mesurer la charge bactérienne des mouches SH et DH au-delà de 24H pour voir si l'infection continue à être contenue dans les mouches SH et, surtout, si elle le devient dans les mouches DH. De manière intéressante, Chambers *et al.* ont induit une blessure sur le thorax de drosophiles une semaine après les avoir infectées et n'ont observé aucune susceptibilité dans ces conditions. Ils ont conclu que la blessure n'était délétère que lorsque l'infection n'est pas encore stabilisée. De plus, nous avons montré que lorsque nous utilisons une solution de bactérie inactivée, aucune différence de survie n'est observée, ce qui appuie le fait que c'est bien cette relation inflammation/infection qui est à la base de la susceptibilité observée des

mouches DH. Enfin, j'ai réalisé 3 expériences de « double-hit » en maintenant les mouches sur un milieu nutritif contenant des antibiotiques et je n'ai observé aucune mortalité des drosophiles.

Toutefois, plusieurs caractéristiques de notre modèle restent à caractériser. Par exemple réaliser un trauma par brûlure serait une autre approche envisageable pour analyser l'impact de l'inflammation sur l'infection. Il faut envisager aussi d'utiliser une autre méthode d'infection que la pique, comme par exemple par le « feeding ». Cependant, par cette technique d'infection, il est possible que les drosophiles ne reçoivent pas la même dose de bactérie au départ, ce qui engendrerait une variabilité au niveau de l'événement infectieux et entraîner un biais dans l'expérience. Pour des raisons techniques, les infections ont été réalisées avec un pathogène exclusif des invertébrés. Une analyse multi-pathogène s'élargissant aux bactéries gram-positives et aux champignons permettrait de tester la spécificité de notre modèle. De plus, l'utilisation de pathogènes de l'homme tel que *Pseudomonas aeruginosa*, première cause d'infection chez les patients atteints de sepsis [Lyczak *et al.* 2000], élargirait la portée de notre étude, d'autant plus que cette bactérie est déjà utilisée dans des études d'interaction infection/inflammation chez la drosophile [Chambers *et al.* 2014 ; Apidianakis *et al.* 2007].

Ainsi la concomitance d'une réponse à la blessure et d'une autre à l'infection est délétère pour la survie de l'organisme. Avant de réaliser une analyse du transcriptome par séquençage des ARN messagers des drosophiles des différents groupes de mon étude (i.e. SH, DH et contrôle), j'ai voulu voir si le fait de moduler l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse à la blessure et à l'infection avait un effet sur leur survie. Un premier candidat auquel nous avons pensé est la cytokine Upd-3. En effet, l'homologue de la cytokine pro-inflammatoire des mammifères IL-6 est impliqué dans l'activation de la voie JAK/STAT lors des réponses à l'infection et à la blessure, et dans la mise en place de ces réponses de manière systémique (voir paragraphe « Voie JAK/STAT et immunité humorale » de l'introduction de thèse). De plus une étude d'association génétique réalisée au laboratoire par Audrey Brisebarre et s'intéressant à une cohorte de plus de 1600 patients atteints de sepsis retrouve comme significative l'association du niveau de l'IL-6, mesuré chez les patients à l'entrée à l'hôpital, avec la mortalité précoce observée de certains patients.

J'ai donc induit une perte de fonction ainsi qu'un gain de fonction de ce gène grâce au système GeneSwitch et j'ai réalisé des expériences de « double-hit » (Figure 28).

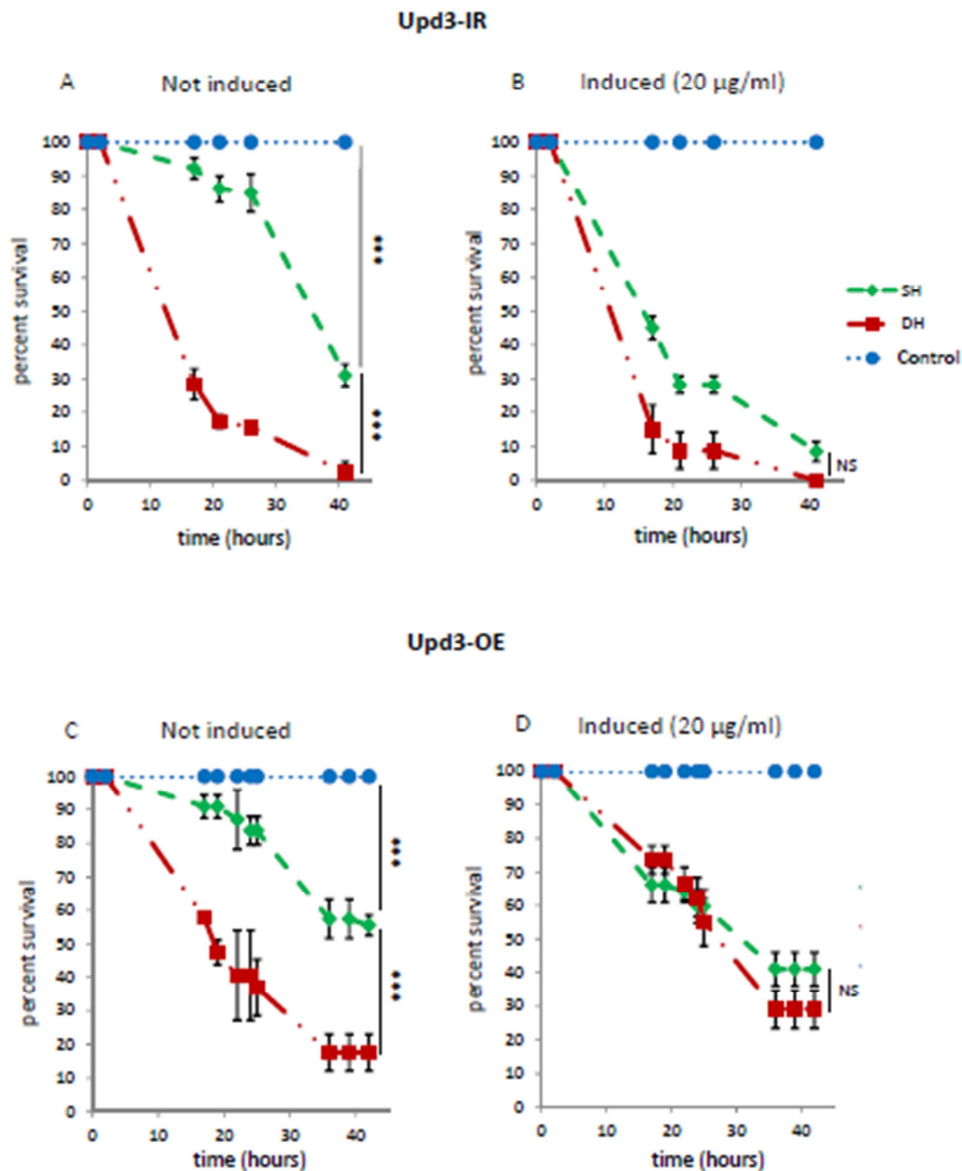


Figure 28: Impact de la modulation de l'expression d'*upd3* sur la survie des mouches SH et DH. Les graphes représentent les survies de mouches DH, SH et contrôle dans un contexte de perte de fonction (*Tubulin>GeneSwitch/+ ; UAS-upd3-IR/+* (Upd3-IR, A, B)) ou de gain de fonction (*Tubulin>GeneSwitch/+ ; UAS-upd3/+* (Upd3-OE, C, D)) pour *upd3*. En ordonnée est représenté le pourcentage de survie et en abscisse, le temps en heure. On constate que, par rapport à la condition contrôle où le système GeneSwitch n'est pas induit (A), la perte de fonction de la cytokine a pour conséquence l'abolition de la différence de survie entre les groupes SH et DH (B). Celle-ci est due à une moins bonne survie des mouches du groupe SH dans ce contexte, la survie des mouches DH n'étant pas impactée. De manière intéressante, par rapport à la condition contrôle (C), le gain de fonction d'*Upd3* a également pour conséquence d'abolir la différence de survie entre les deux groupes (D). Chacun des groupes représentent 80 drosophiles analysées à travers 2 expériences différentes (40 mouches/groupe/expérience). Les analyses statistiques ont été calculés en utilisant la méthode du Log Rank test (***) $P < 0.001$). Les barres d'erreurs représentent les déviations standards.

Au vue de l'importance de cette cytokine dans les réponses inflammatoires et à l'infection, j'ai pensé qu'elle pourrait être impliquée dans la susceptibilité observée des mouches DH. Les gains de fonction et pertes de fonction d'Upd3 résultent tous les 2 en l'abolition de la différence des survies entre les mouches SH et DH. De manière intéressante, la perte de fonction de la cytokine impacte la survie des mouches SH mais pas celle du groupe DH. Les drosophiles SH survivent moins bien et ainsi les courbes de survies des 2 groupes deviennent comparables. Cette susceptibilité à l'infection observée pour les mouches SH dans ce contexte est corrélée avec le niveau d'activation du système GeneSwitch. En effet, j'ai observé qu'au plus la concentration de l'hormone RU486 (ajoutée au milieu nutritif des drosophiles au moment où l'on souhaite activer le système) est grande, au plus l'effet est délétère sur la survie des mouches SH. En ce qui concerne le gain de fonction d'Upd3, avec Alexandre Chuyen, nous avons observé que, dans ce contexte, les mouches DH survivent mieux. De manière étonnante et similairement au contexte de perte de fonction de la cytokine, les mouches SH survivent moins bien et ainsi la différence de survie entre ces drosophiles et celles du groupe DH est abolie. La cytokine Upd3 est impliqué dans la mise en place de la réponse systémique à l'infection et à la blessure [Agaisse et Perrimon 2004 ; Pastor-Pareja *et al.* 2008]. Une régulation contrôlée de l'expression de cette cytokine semble être importante dans notre modèle puisque ni le gain de fonction, ni la perte de fonction n'apporte une amélioration de la survie des drosophiles SH.

Ayant observé que la modulation d'une cytokine dont le rôle est central dans les processus de réponses à l'infection et à la blessure avait un impact sur les survies des mouches SH et DH, nous avons décidé d'analyser le transcriptome des différents groupes de drosophiles de notre étude (DH, SH et contrôle). La différence de survie se mettant en place dans les 20 premières heures d'observation, nous avons choisi d'analyser l'expression des gènes dans les premières heures suite à l'infection. Nous avons donc étudié le transcriptome à 30min, 3H et 6H post-infection. J'ai choisi ces points temporels car la production de cytokine, telle qu'Upd3, est décrite à 3H post infection et la production d'AMPs se situe autour de 6H post-infection. Pour augmenter la stringence de l'analyse différentielle d'expression, j'ai choisi d'utiliser les outils EdgeR et DESeq2, implémentés sous R. Ces deux packages diffèrent notamment par leur méthode de normalisation et d'estimation de la dispersion des données, faisant d'EdgeR une méthode plus puissante et de DESeq2 une

méthode plus sensible [Anders *et al.* 2013]. Après avoir regroupé les gènes par cluster d'expression (méthode des Kmeans) et analysé les caractéristiques fonctionnelles (Flymine), ainsi que les enrichissements en site de fixation de facteur de transcription de ceux-ci (IcisTargetX), nous avons observé que la réponse immunitaire innée est rapidement établie pour les mouches SH, alors qu'elle ne l'est pas dans le groupe DH. Ce résultat est à corrélérer avec la hausse exponentielle de la charge bactérienne observée dans les mouches DH. En effet, si la réponse immunitaire innée n'est pas activée ou si elle est décalée dans le temps, il semble normal alors d'observer ce défaut de résistance des mouches DH. Selon nos données, il semblerait que la réponse immune soit décalée dans le temps puisque l'analyse du transcriptome révèle que les mouches DH activent une réponse immunitaire à 6H par rapport au groupe SH. Inversement, les gènes dont les expressions sont plus élevées dans les mouches DH par rapport aux drosophiles SH sont significativement enrichis pour des annotations relatives à la réponse au stress. Ces résultats montrent un antagonisme entre réponse au stress élevée et réponse immunitaire et suggèrent qu'un contexte inflammatoire élevé désavantage l'hôte face à l'infection en réprimant les processus de défenses antimicrobiens.

De manière intéressante les gènes de la voie JNK, acteurs clés à l'intersection entre processus inflammatoire et immunitaire, sont surexprimés précocement en condition DH par rapport au SH, dès 3 heures après manipulation des mouches. De plus, l'étude fonctionnelle de cette voie *in vivo* sous-entend un effet délétère dans la réponse à l'infection, puisque la déplétion expérimentale de Jra, effecteur de la voie, permet le sauvetage du phénotype DH. De plus, le gain de fonction de ce facteur de transcription a un effet délétère sur les survies des mouches DH et SH. Cependant, certains points restent à éclaircir. En effet, l'inhibition de Kayak (dFos) ne produit pas le même type de résultats. La perte de fonction de ce produit de la voie JNK n'a d'effet sur la survie des mouches ni sur l'écart de survie observée entre SH et DH. Il est surprenant de constater que les deux protéines formant un hétérodimère n'affectent pas la survie des mouches de la même manière. Le niveau d'induction des deux ARNi n'a pas été estimé par qPCR et, nous ignorons donc si ces deux protéines sont réprimées de manière comparable. Ces résultats préliminaires devront être confirmés par l'utilisation d'autres lignées RNAi dirigées contre Kayak et Jra. Néanmoins, Jra peut former un complexe avec d'autres molécules. En effet, Kim *et al.* ont montré en 2007 dans une étude portant sur des cellules SL2 (cellules dérivées de cellules souches embryonnaires) de la

drosophile soumises à un mélange LPS/PGN, que Jra, le facteur de transcription Stat92E et la protéine HMG de la drosophile Dsp1 peuvent former un complexe appelé « répressosome » qui va prendre la place du facteur de transcription Relish aux niveaux des promoteurs de plusieurs effecteurs immuns, comme des AMPs, et inhiber leurs transcriptions *via* le recrutement de l'histone deacetylase HDAC1 [Kim *et al.* 2007]. Les auteurs ont montré, par des expériences de CHIP (Chromatin immunoprecipitation) réalisées sur des cellules SL2 et dirigées contre Relish, Jra, Stat92E et Dsp1, que 15 minutes après traitement avec le mélange LPS/PGN, à la fois Relish et le répressosome sont recrutés au niveau du promoteur de l'AMP Attacine-A. En soumettant ces cellules pendant 8H à ce même mélange, les auteurs ont observé, également par des expériences de CHIP, que Relish n'est plus fixé au promoteur de l'AMP mais qu'à l'inverse le répressosome l'était encore. Kim *et al.* concluent que, sous un traitement LPS/PGN, Relish induit l'activation de la transcription de l'Attacine-A, mais que l'accumulation des protéines Jra, Stat92E et Dsp1 dans le noyau a pour conséquence la terminaison de la transcription *via* la fixation du répressosome en lieu et place du facteur NF-KB au niveau du promoteur de l'AMP. Cette observation ne se limite pas à ce seul AMP. En effet, les auteurs ont observé que c'était également le cas pour les AMPs Attacine-B, Cecropin-A1, Drosocine, Metchnikowin, Cecropin-A2, Cecropin-C et Drosomycine. Les auteurs concluent que l'activité de ce répressosome est requise pour équilibrer les réponses immunitaires. Dès lors, il serait intéressant dans notre étude d'analyser l'impact de la modulation de l'expression des autres molécules de ce complexe, à savoir Stat92E et Dsp1, afin de déterminer si l'on observe les mêmes effets que ceux observés lors de la modulation de l'expression de Jra. Un argument jouant en faveur de cette perspective est que nous retrouvons dans notre analyse du transcriptome à 30 min les AMPs Cecropin A1/A2/C ainsi que les Attacines A/B/C comme étant sous-exprimés dans la condition DH par rapport à la condition SH. De plus, dans l'analyse à 3H, nous retrouvons Jra comme étant surexprimé dans les mouches DH par rapport au groupe SH et comme sous exprimé, les Cecropin A1/A2/C, la Drosocine ainsi que la Metchnikowin. Ainsi, l'implication de Jra dans la susceptibilité observée des mouches DH peut venir de ce phénomène de répression de l'expression d'AMPs *via* la formation du complexe répressosome. Quel que soit le scénario, il est important de noter que la voie de signalisation JNK est impliquée dans les processus de l'inflammation et de l'infection dans plusieurs organismes modèles, de la drosophile aux mammifères. Par exemple, chez la drosophile, cette voie est impliquée dans la transcription

de gènes en réponse à des infections par des microorganismes divers [Boutros *et al.* 2002] mais également en réponse aux ROS produits lors d'un dommage tissulaire afin de maintenir l'homéostasie du tissu [Santabárbara-Ruiz *et al.* 2015]. Ainsi, dans les mouches DH, la voie de signalisation JNK pourrait être activé à la fois par la blessure aseptique et par l'infection de manière indépendante, menant de ce fait à son hyperactivation et ayant pour conséquences des effets délétères incluant une réponse inappropriée à l'infection.

Par ailleurs, l'analyse RNA-seq à 3 heures montre que les processus de la réponse immunitaire et de la sécrétion sont plus fortement exprimés en condition SH. L'enrichissement en annotation pour des gènes impliqués dans les processus de sécrétion a particulièrement retenu notre attention. L'analyse plus fine des gènes de ce cluster a permis d'ajouter le facteur de transcription CrebA aux gènes candidats analysés dans cette étude. Chez les mammifères, le facteur de transcription CrebA/CrebH est impliqué dans la mise en place d'une réponse inflammatoire systémique [Zhang *et al.* 2006] et plusieurs membres de la famille de ce facteur sont impliqués dans des voies de signalisation activées suite à l'induction des processus de l'inflammation et de l'infection [Newton *et al.* 2012]. Nous avons pu vérifier expérimentalement *in vivo* qu'une déplétion de CrebA affecte spécifiquement la survie des mouches blessées en condition SH. Ces résultats suggèrent un effet protecteur de l'induction de CrebA dans la réponse à l'infection. Cet effet est confirmé par le gain de fonction de ce facteur de transcription qui a pour conséquence d'améliorer la survie des mouches SH, mais également celle des mouches DH indiquant que la susceptibilité observée de ces drosophiles provient en partie d'un défaut d'expression de ce facteur de transcription.

Nous pouvons observer deux processus antagonistes dans la réponse à l'infection en condition DH : Une sur-expression de la voie JNK et une sous-expression de CrebA. Pris ensemble ces résultats nous permettent de faire l'hypothèse qu'en condition DH, l'inflammation induit la voie JNK qui inhibe la synthèse de CrebA et donc réprime son effet protecteur vis-à-vis de l'infection. Toutefois l'interaction entre JNK et CrebA reste à prouver. Pour ce faire, via le système GeneSwitch, nous pourrions induire une perte de fonction de Jra et analyser le niveau d'expression de CrebA dans les mouches DH par RT-Q-PCR et comparer cette expression à celle retrouvée dans un contexte sauvage. Des expériences d'épistasie seraient intéressantes à réaliser. En d'autres termes, peut on améliorer la survie

des mouches en contexte de gain de fonction de Jra en induisant en même temps une surexpression de CrebA ?

L'implication de la voie JNK dans la surmortalité à l'infection nous a conduits à rechercher quelle(s) voie(s) moléculaire(s) pouva(en)t agir en amont. De récentes études ont montré que Grindelwald (Grnd), une protéine transmembranaire homologue aux membres de la famille des récepteurs Tumour Necrosis Factor (TNFR) pouvait lier Eiger (Egr), le seul TNF connu chez la drosophile et activer in vivo la signalisation JNK [Andersen *et al.* 2015]. De manière intéressante, nous avons montré que ce récepteur est impliqué dans la réponse à l'infection, mais pas dans la susceptibilité induite par la blessure précédant l'infection. Ces résultats suggèrent donc que la voie JNK et Grnd agissent de manière indépendante dans ce processus. Cependant nos résultats montrent que Grnd semble être impliqué dans la réponse à l'infection, ce qui n'a pas été mis en évidence jusque-là.

Un point important est que j'ai induit la blessure aseptique dans le thorax des drosophiles. De ce fait, celle-ci affecte majoritairement les muscles indirects du vol. Il est important de savoir que les tissus musculaires sont connus pour avoir un rôle protecteur face à une infection, en étant capable notamment d'activer les voies de signalisation menant à la production d'AMPs [Chatterjee *et al.* 2016]. Une autre étude a montré qu'ils permettent une résistance à une blessure infectieuse réalisée dans le thorax [Apidianakis *et al.* 2007]. De plus, Chambers *et al.* ont montré que la blessure aseptique induite dans le thorax des mouches, et non dans l'abdomen de celles-ci, conduit à une moindre résistance face à l'infection [Chambers *et al.* 2014]. Ce résultat, reproduit par Alexandre Chuyen au laboratoire, confirme que les muscles puissent avoir une fonction spécifique dans la réponse de l'hôte face à une inflammation stérile. Il est donc intéressant d'étudier la spécificité tissulaire des voies de signalisation que nous avons mis en lumière dans cette étude et, de manière évidente, les muscles sont en tête de liste.

Le fond génétique des drosophiles a un impact significatif sur la survie des drosophiles lors d'une infection [Bou Sleiman *et al.* 2015]. Dans le cas de notre expérience de « double-hit », une des questions intéressantes est de savoir quels sont les facteurs génétiques de l'hôte influençant la susceptibilité des mouches DH face à l'infection. Existe-t-

il une variabilité dans l'écart de survie observé entre DH et SH en fonction du fond génétique des mouches de différentes lignées ? Il existe, chez la drosophile, une librairie constituée de plus de 200 lignées isogéniques entièrement séquencées (DGRP pour *Drosophila genetics reference panel*; Mackay *et al.* 2012), permettant ainsi d'analyser l'association de polymorphismes avec un phénotype d'intérêt. Au cours de ma thèse, j'ai analysé la réponse au « double-hit », en termes de survie, de 30 lignées de drosophiles issues des lignées DGRP. Il est important d'estimer les différences de réponse au « double-hit » en prenant en compte toute la cinétique des survies des différents groupes de notre expérience. Pour avoir une valeur représentative de cette différence, avec Lionel Spinelli du TAGC, nous avons pensé à utiliser les P.valeurs calculées par la méthode du log rank test, qui prennent en compte la cinétique de survie des drosophiles. Cette P.valeur doit être calculée par rapport à un groupe contrôle survivant à 100% tout au long de l'observation, faite sur 50 heures. Ainsi, j'ai calculé une P.valeur pour le groupe SH et une pour le groupe DH pour chacune des 29 lignées que j'ai pu tester. En faisant le rapport de ces P.valeurs ($Pval(SH) / Pval(DH)$), nous obtenons une valeur représentative de l'écart de survie observée pour chaque lignée, assimilable à un score de sévérité. Si ce rapport est égale à un, alors il n'y a pas de différence de survie entre les mouches SH et DH. S'il est inférieur à un, cela signifie que les mouches DH survivent mieux que les mouches SH. Enfin plus ce rapport est supérieur à un, plus l'écart de survie entre les mouches DH et SH est important. Les rapports $Pval(SH) / Pval(DH)$ pour les 29 lignées montrent un continuum entre 1,1 et 17, indiquant une forte contribution du fond génétique au phénotype observé. En utilisant l'outil mis à disposition en ligne sur le site <http://dgrp2.gnets.ncsu.edu/>, il nous est possible de réaliser l'étude d'association de polymorphismes avec le score de sévérité que nous avons calculé. Aucun résultat significatif n'est obtenu pour les 29 lignées testées. Il est nécessaire de cribler l'ensemble des lignées de la librairie afin d'améliorer la puissance statistique de l'analyse. Il serait aussi intéressant de croiser les résultats de notre analyse du transcriptome avec les résultats de cette nouvelle analyse.

En conclusion, nous avons confirmé les observations de Chambers *et al.* quant à la susceptibilité accrue à l'infection de drosophiles blessées par piqure au thorax. Nous avons montré que cette susceptibilité est dépendante de l'importance de la blessure. Outre l'activation plus importante des voies de réponse au stress, que nous avons observée grâce à

notre analyse du transcriptome, d'autres voies (comme les voies métaboliques) sont sans doute impactées suite à un stress sévère tel qu'un trauma (représenté par une blessure stérile dans notre étude). Il est intéressant de noter que Okabe et al. ont observé un effet comparable à une hyperglycémie chez des larves de drosophiles qui reçoivent une blessure par laser [Okabe *et al.* 2015]. En effet, suite à cette blessure, ils ont observé une augmentation dans l'hémolymphe du niveau de tréhalose, un disaccharide composé de deux molécules de glucose. *Via* leur méthode de blessure, et après avoir constaté que la lésion de 2% de la masse musculaire totale n'avait pas d'effet sur le niveau de tréhalose, ils ont induit la lésion de 5% de cette masse et ils ont observé une augmentation significative du niveau de ce disaccharide à 24 heures suite à la blessure. Nous pouvons imaginer que, lors d'une infection suivant une blessure, cette augmentation du tréhalose puisse être profitable au pathogène pour sa prolifération, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la plus grande charge bactérienne observée dans les mouches DH. Une perspective serait alors de mesurer le niveau de ce disaccharide dans les mouches SH, DH et contrôle afin de voir si il existe une corrélation entre celui-ci et le niveau de la charge bactérienne mesurée. Il est important de mesurer ce niveau dans l'hémolymphe spécifiquement, puisque nous infectons les drosophiles par piqure directement dans ce liquide physiologique. Nous pourrions aussi bloquer le clivage de ce composé en deux molécules de glucose, en induisant l'expression d'un ARNi dirigé contre la tréhalase (une glycoside-hydrolase). Pour cela j'utiliserai le système GeneSwitch et j'induirai la perte de fonction de cet enzyme dans l'organisme entier en utilisant un promoteur ubiquitaire tel que le promoteur de la tubuline. Je mesurerai la survie, la charge bactérienne ainsi que le niveau de glucose dans l'hémolymphe, mais également le niveau de transcription des AMPs (Diptéricine, Droscine etc...), par qPCR, pour voir l'impact d'un tel blocage sur la réponse immunitaire.

Nous pourrions aussi moduler la disponibilité de nutriments dans l'hémolymphe par la modulation de l'expression d'acteurs de la voie de l'insuline. En effet les muscles thoraciques sont importants pour le vol des drosophiles et nous pouvons imaginer que l'organisme œuvre de manière plus intensive pour réparer les dommages causés par une piqure qui détériore le tissu musculaire. Il pourrait alors s'installer un transport de nutriments vers le site de blessure et celui-ci pourrait être profitable au pathogène. Il a été montré que la réponse immunitaire induit une allocation des ressources énergétiques

différente à celle observée dans une situation normale [DiAngelo *et al.* 2009]. En effet, DiAngelo *et al.* montrent que l'activation de la voie de signalisation Toll dans le corps gras entraîne, outre l'activation de la réponse immunitaire innée, la réallocation des ressources énergétiques. Celle-ci est la conséquence de l'inhibition de la voie de l'insuline dans les cellules du corps gras, mais aussi de manière non-autonome dans tout l'organisme, menant à la réduction du stockage des nutriments et à une réduction de la croissance cellulaire et les auteurs proposent que l'interaction entre la voie de signalisation Toll et la voie de l'insuline ait évolué comme un moyen de contrôle pour l'allocation d'énergie pendant un événement infectieux. *Via* le système UAS-GAL4, ils ont induit l'expression de certains gènes de la voie Toll, pendant le développement larvaire, spécifiquement dans le corps gras. Ils observent qu'une activation constitutive du récepteur Toll induit une réduction du niveau de triglycérides et, qu'à l'inverse, une activation constitutive du récepteur dInR (récepteur de la voie de l'insuline) entraîne une hausse du niveau de triglycérides mesuré dans la larve entière. Pour étudier l'interaction entre la voie de signalisation Toll et la voie de l'insuline, qui promeut l'anabolisme de triglycéride et de glycogène [Saltiel *et al.* 2001], ils ont analysé le niveau de phosphorylation de la kinase dAkt/dPKB de la voie de l'insuline dans un contexte d'activation de la voie Toll, chez des drosophiles femelles adultes âgées de 4 à 7 jours, soit *via* l'activation constitutive du récepteur Toll spécifiquement dans le corps gras, soit par l'activation de l'expression du gène de dMyd88 (une protéine adaptateur se situant en aval du récepteur Toll) dans le corps gras également. De manière intéressante, ils ont observé que la phosphorylation de dAkt/dPKB est réduite dans un contexte d'activation de la voie Toll. Les mêmes effets sont observés suite à l'activation de l'expression du facteur de transcription Dif dans le corps gras. Ils observent également les mêmes effets lors d'une infection de drosophiles femelles adultes par la bactérie à Gram-négatif *Micrococcus luteus* ou par le champignon *Beauveria bassiana* (niveau de phosphorylation de dAkt/dPKB mesuré à dix heures post-infection). De plus, ils montrent également une réduction du niveau de triglycérides dans ces conditions, ce qui revient à dire qu'une activation physiologique de la voie de signalisation Toll entraîne une baisse du niveau de ces glycérides. Mais si cette réduction du stockage des lipides est la conséquence d'une réallocation énergétique généralisée, les auteurs émettent l'hypothèse que, dans un animal en développement comme la larve de la drosophile, les processus de croissance, qui sont les plus coûteux en terme énergétique, sont affectés. C'est en effet le cas puisqu'ils observent une réduction

systemique de la taille de l'animal. Ainsi, la résistance à l'infection des drosophiles reposerait, au moins en partie, sur un transfert, une réallocation, de l'énergie utilisée dans les processus de croissance et de ponte (conduisant à une fécondité réduite des drosophiles infectées) vers les processus de l'immunité. De manière intéressante, les auteurs n'observent pas d'interaction entre la voie de l'insuline et la voie de signalisation IMD ; en effet la sur-expression spécifique dans le corps gras de PGRP-LCa et du facteur de transcription Relish ou, l'activation physiologique de cette voie par infection avec des bactéries à Gram-négatif *E.coli*, ne modifie pas le niveau de triglycérides. Dans notre étude, nous avons observé, *via* notre analyse de transcriptome, que les processus de ponte sont inhibés chez les mouches DH en comparaison aux mouches SH. Il est possible que ce processus non essentiel soit « bloqué » afin d'utiliser l'énergie pour des processus plus importants pour le maintien de l'organisme. Je propose de réaliser des expériences de « double-hit » sur des drosophiles femelles adultes âgées de 7 à 10 jours dans lesquelles des acteurs de la voie de signalisation Toll (comme le récepteur Toll, la protéine adaptatrice dMyd88 et le facteur de transcription Dif) sont inhibés dans le corps gras (grâce au système GeneSwitch) et d'observer leur survie, la charge bactérienne et le niveau de triglycéride par comparaison avec une condition infection simple ou contrôle. Le but est de savoir si le fait de bloquer l'activation de la voie de signalisation Toll, et donc indirectement de lever l'inhibition de la voie de l'insuline dans le corps gras, a pour conséquence un niveau plus grand de stockage des nutriments sous forme de triglycérides dans le corps gras et donc une moindre disponibilité énergétique pour l'organisme. L'expérience montrera peut être une réduction de la charge bactérienne dans les mouches DH par rapport au groupe SH, l'agent infectieux ne pouvant pas, ou en tout cas de manière moindre, détourner des éléments énergétiques de l'hôte. Il est vrai que dans notre modèle, nous induisons une infection avec *Pseudomonas entomophila*, qui est une bactérie à Gram-négatif, et que dans ce cas-là, c'est la voie de signalisation IMD qui est théoriquement activée. Cependant dans notre analyse du transcriptome à 30 minutes et 3 heures dans le groupe SH, nous observons l'induction de l'expression des gènes codant les PRRs PGRP-SD et PGRP-SA, impliqués dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif et donc dans l'activation de la voie de signalisation Toll ainsi que la protéine SPE (Spätzle Processing enzyme), impliquée dans le clivage de la pro-cytokine Pro-Spätzle en la cytokine Spätzle, qui active la voie de signalisation Toll. Nous observons également l'activation de la voie IMD par la transcription,

à 30 minutes et 3 heures post-infection, de l'AMP diptéricine par exemple. On peut donc penser que la voie de signalisation Toll n'est pas strictement requise dans cette réponse et que la voie IMD seule peut défendre l'organisme contre l'agent pathogène.

Il est intéressant de noter qu'une perte de fonction par ARNi dans le tissu musculaire du facteur de transcription CrebA a pour conséquence une augmentation du niveau de glucose dans l'hémolymphe [Ugrankar et al. 2015]. En effet, Ugrankar et al. ont mesuré le niveau de glucose, dans l'hémolymphe de larves de drosophile, suite à la perte de fonction, par ARNi, de 213 facteurs de transcription dans les muscles et dans le corps gras spécifiquement via le système UAS GAL4. De manière intéressante, la perte de fonction dans le tissu musculaire du facteur de transcription CrebA induit une augmentation du niveau de glucose dans l'hémolymphe. Dans notre analyse du transcriptome, à 3 heures, les mouches DH montrent une sous expression des cibles transcriptionnelles du facteur de transcription CrebA. De plus, les résultats issus de l'analyse différentielle d'expression par l'outil EdgeR montrent que *CrebA* est sous-exprimé dans la condition DH et contrôlé par rapport à la condition SH, indiquant que cette réduction de l'expression de CrebA est due à la blessure. Nous avons par ailleurs confirmé l'implication de CrebA dans la susceptibilité accrue face à l'infection en réalisant des expériences de « double-hit » dans un contexte de gain ou de perte de fonction ubiquitaire pour ce facteur de transcription, et nous avons observé que la perte de fonction de CrebA a pour conséquence une moins bonne survie des mouches SH sans impacter les mouches DH. Le gain de fonction, quant à lui, a pour conséquence une meilleure survie des mouches SH et DH. Une hypothèse, qui va dans le sens d'une implication des ressources énergétiques dans la susceptibilité accrue des mouches DH face à l'infection, est que la sous-expression de *CrebA* puisse entraîner une augmentation du niveau de glucose dans l'hémolymphe, et celle-ci pourrait être profitable au pathogène et sa prolifération. Je propose de vérifier cette hypothèse en mesurant la charge bactérienne et le niveau de glucose dans l'hémolymphe des mouches SH et DH dans un contexte de perte de fonction ubiquitaire, *via* le système GeneSwitch, pour ce facteur de transcription afin d'observer si la prolifération bactérienne est plus grande et si elle est concomitante avec une augmentation du niveau de glucose dans l'hémolymphe. Je propose également de réaliser ces expériences dans un contexte de gain de fonction pour CrebA afin de voir si les effets seront inverses concernant la charge bactérienne et le niveau de glucose des drosophiles

dans ce contexte. Ugrankar et al. ayant montré que l'augmentation du niveau de glucose dans l'hémolymphe est observé dans un contexte de perte de fonction pour CrebA spécifiquement dans le tissu musculaire, je propose de réaliser ces expériences en induisant une perte de fonction de manière ubiquitaire, mais également dans un contexte de perte de fonction dans le tissu musculaire spécifiquement.

Le tissu musculaire est un tissu immunocompétent capable d'activer les voies de signalisation de la réponse immunitaire innée en réponse à une infection [Chatterjee *et al.* 2016]. Le fait d'altérer les muscles peut être donc délétère pour la réponse à l'infection, ce qui pourrait peut-être expliquer la moins forte activation de la réponse à l'infection observée chez les mouches DH par rapport aux mouches SH. Je propose de réaliser des expériences de « double hit » chez des drosophiles surexprimant des gènes de la réponse immunitaire (le facteur de transcription Relish, les PRRs PGRP-SD et PGRP-SA entre autres) spécifiquement dans les muscles pour déterminer si ces gains de fonction peuvent compenser l'effet de la blessure.

Nous pourrions également induire l'expression des gènes impliqués dans la structure et la fonction des muscles squelettiques (SMG) et qui jouent un rôle soit dans la reconstruction du tissu musculaire soit sa détoxification suite à une blessure ou à une infection. En effet, Apidianakis et al. ont montré le rôle de ces gènes dans ces processus suite à une blessure ou à une infection dans le thorax (Figure 17 page 64). Il est possible que le fait de sur-exprimer ces gènes entraîne une meilleure reconstruction tissulaire (gain de fonction pour l'actine 88F, la tropomyosine) et une détoxification plus efficace (gain de fonction pour le gène de la Glutathione S transférase).

Partie II

Partie II

I) A la recherche de variants potentiellement impliqués dans la survenue d'un choc septique

Introduction : Les études d'associations pangénomiques : Théorie

L'objectif de l'épidémiologie génétique est de caractériser la composante génétique des maladies chez l'homme, c'est-à-dire d'identifier les facteurs génétiques impliqués et d'estimer leurs effets. Elle repose sur le développement de méthodes statistiques intégrant les marqueurs génétiques. Le principe général est de mesurer la corrélation entre ces marqueurs et le phénotype étudié, qui peut être par exemple un trait quantitatif ou binaire.

Les marqueurs génétiques apportent deux types d'information : la liaison génétique (au niveau familiale) et l'association (au niveau de la population). Ainsi, l'échantillonnage des études peut être représenté par des sujets apparentés (frères et sœurs par exemple) ou non apparentés (étude cas/témoin).

Dans cette section, je ne détaillerai que les études d'associations de types cas/témoin (ex : malade/non-malade).

L'analyse d'association est basée sur l'existence d'association non aléatoire entre allèles à des loci différents. Cette association non-aléatoire est appelée déséquilibre de liaison (LD), terme proposé en 1960 par Lewontin et Kojima [Lewontin et Kojima 1960]. Elle est observée entre des marqueurs proches (50 à 100 kilobases). Cette caractéristique permet une localisation fine des mutations causales non observées. Le principe est d'identifier les marqueurs génétiques dont les fréquences alléliques sont significativement différentes entre les cas (malades) et les témoins (sain).

Les avancées des technologies de génomique à haut-débit nous permettent d'avoir accès à une grande part de la variabilité du génome par l'identification de centaines de milliers de ces marqueurs, appelés SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide). Le projet international HapMap a ouvert la voie aux études d'association pangénomiques (GWAS pour Genome Wide Association Study), c'est-à-dire à la recherche d'association sur le génome

entier [International HapMap Consortium 2005]. En effet, ce projet a pour but de développer une carte d'haplotype pour décrire les patrons communs de variations génétiques du génome humain.

L'approche GWAS est une stratégie d'étude optimale pour détecter les variants fréquents. Mais un grand nombre de tests statistiques est réalisé et des problèmes de stratifications de population peuvent exister et doivent être pris en compte. Les variations structurelles telles que les variations de nombres de copies ou l'épigénétique, échappent aux études d'association pangénomiques. Par ailleurs, des facteurs de l'environnement, seuls ou en interaction avec des facteurs génétiques, expliquent une partie du risque de la maladie.

Les résultats issus des analyses GWAS représentent le plus probablement une association indirecte (Figure 29). En effet, ces études identifient des signaux d'association et non les variants causaux. Pour détecter le ou les variants causaux, il nous faudrait avoir la séquence entière du génome de plusieurs milliers de malades et de témoins, ce qui est rendu impossible par le fort coût de l'étude.

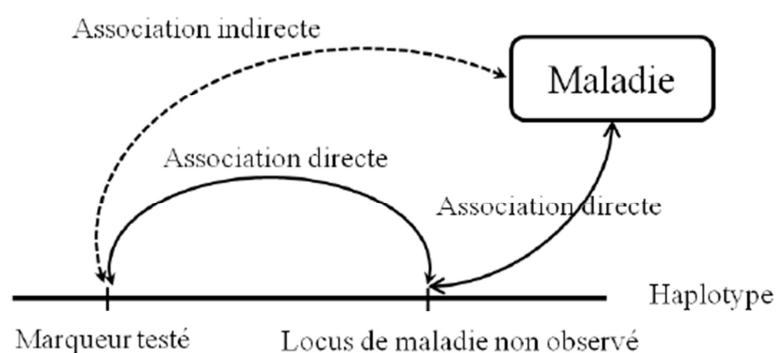


Figure 29: Association directe et indirecte. Généralement, les analyses d'association révèlent des associations indirectes des marqueurs. Ceci est dû au fait que nous n'avons pas accès à l'ensemble des polymorphismes du génome. Ainsi, le marqueur ne contribue pas à la variabilité du phénotype (maladie), mais il se trouve physiquement proche du variant de susceptibilité et leurs allèles sont en déséquilibre de liaison. Adapté de Balding 2006.

La première étude d'association pan-génomique a été publiée en 2005. Elle étudie l'association entre la dégénérescence maculaire et les polymorphismes communs [Klein *et al.* 2005]. Aujourd'hui, il existe des centaines d'études d'association pangénomiques, et celle-ci sont répertoriées dans un catalogue en ligne mis à jour régulièrement : <http://www.genome.gov/gwastudies/>.

Le déroulement d'une analyse jusqu'à sa validation biologique se présente comme suit :

- Obtenir l'information génétique des cas et contrôles via l'utilisation de puce à polymorphismes nucléotidiques
- Réaliser le contrôle qualité (QC) sur les données génétiques collectées
- Etudier les stratifications existantes au sein de la totalité du groupe étudié.
- Réaliser l'étude d'association
- Répliquer l'étude sur une nouvelle cohorte d'individus: Lorsque la taille de l'échantillon et le nombre de tests sont très grand, un biais peut augmenter de manière importante le taux de faux positifs. Une étude dite de « réplification » est nécessaire pour confirmer l'implication d'un marqueur dans la maladie.
- Réaliser les validations biologiques/cliniques

Les marqueurs génétiques: polymorphismes nucléotidiques (Single nucleotide polymorphism, SNP)

Un SNP est une variation au sein de la séquence d'ADN au niveau d'un nucléotide. Cette variation peut être observée entre deux membres d'une même espèce, ou entre deux chromosomes d'une même paire au sein d'un individu. Par exemple, deux fragments d'ADN séquencés à partir de deux individus différents présentent une différence au niveau d'un seul nucléotide : ATTCGGT et ATTCGCT. Dans ce cas, nous sommes en présence de deux allèles : l'allèle G et l'allèle C.

Afin qu'une variation soit retenue comme un polymorphisme nucléotidique, elle doit avoir une fréquence d'au moins 1% au sein de la population étudiée.

Ces variations dans l'ADN peuvent affecter, par exemple, la manière de répondre et de se défendre face à un pathogène, la réponse inflammatoire et son ampleur.

Odds Ratio

L'Odds Ratio, ou rapport des chances, est un rapport de deux risques relatifs : le risque d'observer un allèle chez les individus malades par rapport à la population contrôle divisé par le risque d'observer l'autre allèle toujours chez les individus malades par rapport aux contrôles. Ainsi ce rapport permet de mesurer la force de l'association et le sens de l'association entre la maladie et le SNP. Si ce rapport est égale à un, alors la distribution du polymorphisme en question est aléatoire au sein de la population et donc indépendant du phénotype étudié (l'occurrence d'une maladie par exemple). S'il est supérieur ou inférieur à un, le SNP est associé au phénotype étudié (et dans le cas d'une maladie, il est susceptible d'être un élément expliquant en partie la maladie).

Des SNPs particuliers : Les Tag SNP.

Un Tag SNP est un marqueur génétique associé à un ou plusieurs autres polymorphismes. Le coefficient de corrélation de Pearson (r^2) entre ces SNPs est calculé et ceux ayant les scores les plus forts peuvent être informatifs pour un groupe de marqueurs, réduisant ainsi le nombre de SNP présents sur la puce de génotypage tout en maintenant le niveau de couverture de la variabilité. Autrement dit, l'information apportée par tous les SNPs du groupe est la même que celle apportée par un seul de ces SNPs. Généralement, un SNP est en déséquilibre de liaison avec un autre si le coefficient de corrélation entre ces SNPs est supérieur ou égal à 0,8.

Contrôle qualité des données génétiques collectées

Les artefacts techniques sont susceptibles d'amener des biais dans les études d'associations pangénomiques. En effet, le génotypage à haut-débit nécessite certaines conditions quant à la qualité de l'ADN analysé. Si celles-ci ne sont pas satisfaites, elles peuvent conduire à des erreurs de génotypage. De plus, des erreurs peuvent être commises quant au transfert de l'échantillon d'ADN, à l'assignation de celui-ci au sujet correspondant de l'étude par exemple. Les analyses de contrôle qualité des données existent pour minimiser l'impact de tels biais dans l'étude d'association. Une fois les données génétiques collectées pour tous les individus de l'étude, il est donc important d'en contrôler la qualité. Ainsi pour chaque polymorphisme identifié, les paramètres suivant sont étudiés :

- Le taux de succès ou « Call Rate »
- La fréquence de l'allèle mineur
- L'équilibre d'Hardy-Weinberg

Ce contrôle qualité s'applique aussi à l'ensemble des individus de l'analyse. En effet, lorsque l'ADN est de mauvaise qualité ou de faible concentration, son amplification peut échouer ou le signal de fluorescence peut être trop faible pour déterminer le génotype. Il peut en résulter donc un grand nombre de données manquantes pour un sujet. Ainsi, les individus dont le call rate est faible (< 95%) sont exclus de l'étude du fait de leur génotype incomplet.

Taux de succès ou Call Rate

Pour chaque individu, le Call Rate est la proportion de SNP observés par échantillon. Pour chaque SNP, il représente la proportion des données obtenues à travers l'ensemble des échantillons. Le pourcentage de donnée manquante par échantillon est un indicateur de la qualité de l'ADN séquencé.

En général, on exclut les SNPs présentant un call rate inférieur à 95%. En d'autres termes, on ne garde un SNP pour l'analyse que si on le retrouve génotypé avec succès pour

au moins 95% des individus de l'étude. La valeur seuil de ce call rate dépend de la fréquence de l'allèle mineur (Minor Allele Frequency ou MAF) (voir paragraphe suivant « Fréquence de l'allèle mineur »). Les SNP dits communs (MAF > 5%) sont exclus si le call rate est inférieur à 95% ; Cependant pour les SNPs moins fréquents (MAF < 5%) le critère d'exclusion est de 99% et ce parce que l'analyse d'association dans ce cas est plus sensible aux erreurs de génotypage.

Le pourcentage de donnée manquante par échantillon est un indicateur de la qualité de l'ADN séquencé.

Fréquence de l'allèle mineur

Pour chaque SNP, il y a deux allèles. Pour chaque allèle, la fréquence allélique est la proportion de cet allèle à travers tous les échantillons. Ainsi pour chaque SNP, la plus petite fréquence allélique est appelé fréquence de l'allèle mineur.

L'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE)

L'équilibre de Hardy-Weinberg est une théorie de génétique des populations, qui postule qu'au sein d'une population « idéale », il y a équilibre des fréquences alléliques et génotypiques d'une génération à l'autre.

Pour que l'équilibre existe, plusieurs hypothèses sont faites :

- La population est de taille infinie
- La panmixie généralisée : Celle-ci est le croisement aléatoire entre individus. Elle recouvre :
 - L'équiprobabilité des gamètes : la pangamie
 - La rencontre des gamètes au hasard (formation aléatoire des couples) : la panmixie
 - La ségrégation aléatoire des gamètes lors de la méiose

- L'absence de mutations sur les allèles considérés
- L'absence de sélection d'individus
- Les générations ne se chevauchent pas. Elles sont dites discrètes.

De cet équilibre résulte la loi de distribution génotypique suivante :

$$p^2 + q^2 + 2pq = 1$$

Soient « A » et « a » deux allèles de fréquence respectivement p et q :

- p^2 : fréquence d'un génotype homozygote AA
- q^2 : fréquence d'un génotype homozygote aa
- $2pq$: fréquence d'un génotype hétérozygote Aa

L'écart par rapport à la loi de Hardy-Weinberg est estimé grâce au Test du χ^2 de Pearson, en comparant la structure des fréquences génotypiques obtenues à partir des données observées, aux fréquences calculées selon la loi de Hardy-Weinberg.

Stratification au sein de la population

Les études d'associations en population permettent d'étudier un grand nombre de cas et de témoins indépendants. Cependant ils sont particulièrement sensibles aux problèmes de mésappariements des cas aux témoins, aux variables confondantes (variable répartie de manière non aléatoire dans la population) et aux structures génétiques cachées de la population. Ce problème est notamment observé lorsque la population étudiée est composée de sous-population génétiquement différentes (exemple : origine ethnique) et ainsi des signaux d'association peuvent refléter cette différence plutôt que l'association au phénotype étudié.

Les tests d'associations supposent que les sujets soient non apparentés. L'identification des échantillons apparentés peut être réalisée par des approches reposant sur l'estimation de l'identité par descendance (IBD) [Purcell *et al.* 2007 ; Kong *et al.* 2008]. La proportion des allèles partagés par descendance entre deux individus est représentée par une valeur allant

de 0 à 1, la valeur 1 signifiant soit une duplication de l'échantillon de l'individu, soit la présence de vrai jumeau.

La définition de la population au sens génétique peut être exprimée de la manière suivante : Deux individus A et B appartiennent à la même population si la probabilité qu'ils aient un descendant commun est plus grande que zéro, et cette probabilité est plus grande que celle que A et B aient un descendant commun avec un troisième individu C qui appartient à une autre population.

La présence de stratification au sein d'une population peut être donc due à la présence d'ancêtre et d'histoires démographiques différentes au sein des échantillons étudiés [Cardon et Palmer 2003 ; Wang *et al.* 2005]. Dans ce cas, de nombreuses associations résultent d'une structure génétique différentielle. Pour minimiser cet effet, il convient de sélectionner les cas et les contrôles à partir d'une même population. Des méthodes de correction de la famille des statistiques multivariées existent, comme l'analyse en composante principale [Menozzi *et al.* 1978] et le positionnement multidimensionnel (MDS), toutes deux étant des méthodes statistiques de regroupement.

Résultats : Association de polymorphismes au développement d'un choc septique : données de la cohorte PROWESS (The Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis).

Une personne est atteinte de sepsis s'il y a une infection prouvée ou suspectée, le plus souvent d'origine bactérienne, et au moins deux des critères suivants définissant le SIRS :

- Tachycardie : fréquence des battements cardiaques supérieure à 90 battements/min.
- Fièvre (supérieur à 38,5°C) ou hypothermie (inférieur à 35°C).
- Respiration accélérée (supérieure à 20 respirations/min) ou une pression artérielle en CO₂ inférieur à 32 mmHg).
- Nombre de globules blancs élevé (supérieur à 12 000 cellules/mm³) ou faible (inférieur à 4000 cellules/mm³).

Un sepsis est donc un SIRS accompagné d'une infection grave (Figure 30) [Hotchkiss and Karl 2003 ; Angus and van der poll 2013]. Il se développe quand la réponse inflammatoire atteint un niveau tel que des altérations physiologiques se développent chez l'hôte.

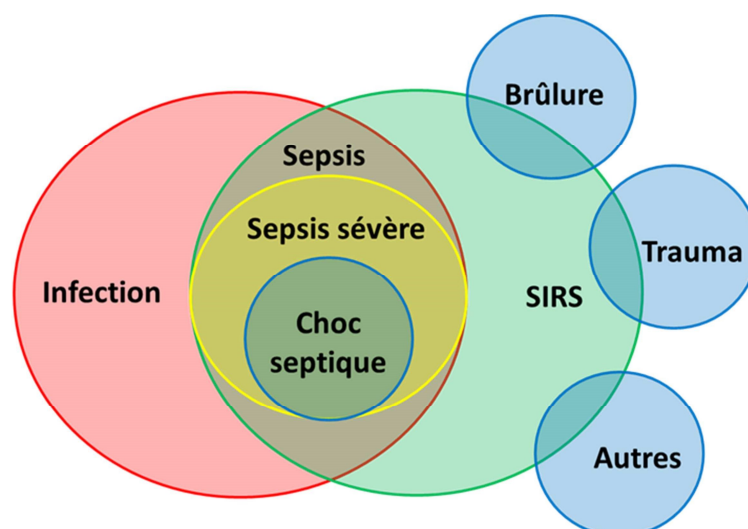


Figure 30 : Relations entre inflammation et infection. Le sepsis est un syndrome causé par l'interaction entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) et l'occurrence d'une infection. Plusieurs événements peuvent induire ou favoriser le développement d'un SIRS tel qu'une brûlure, un trauma et d'autres paramètres tels que l'âge du patient. Adapté de Bone *et al.* 1992.

Le sepsis sévère est une aggravation du sepsis. Pour les patients atteints de sepsis, le diagnostic repose sur deux dysfonctionnements d'organes ou une forte diminution de la pression sanguine. Ces problèmes sont causés par la réponse systémique induite par l'infection initiale. Le coma, une mauvaise coagulation, des insuffisances cardiaques, rénales ou respiratoires sont les principales défaillances d'organes observées.

Le choc septique est, quant à lui, une aggravation du sepsis sévère accompagnée d'hypotension artérielle [Angus and van der poll 2013] (Figure 31). L'infection cause alors une hypotension dangereuse et s'accompagne de défaillance cardiovasculaire. D'autres symptômes observés lors du développement d'un choc septique sont les suivants :

- Extrémités pâles ou froides
- Fièvre
- Hypothermie
- Tachycardie
- Dysurie
- Vertiges
- Respiration courte

Le développement d'un choc septique est influencé par divers paramètres, parmi lesquelles l'âge du patient, les comorbidités et de nombreux facteurs génétiques.

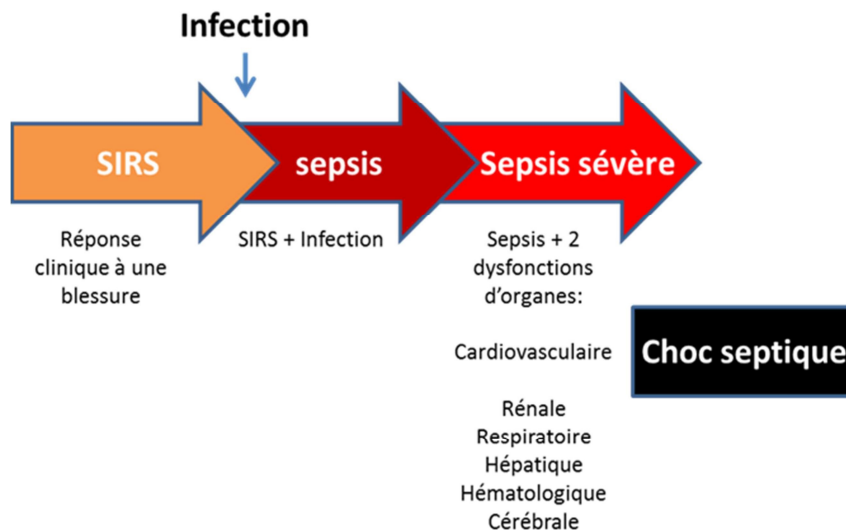


Figure 31 : Du SIRS au choc septique. Un SIRS est une réponse inflammatoire systémique induite par un événement tel qu'une blessure. S'il est accompagné d'une infection, un SIRS peut évoluer vers le syndrome du sepsis. Si les patients présentent en plus deux défaillances d'organes, on parle alors de sepsis sévère. Enfin, si le système cardiovasculaire présente des dysfonctions, on parle de choc septique. Adapté de Bone *et al.* 1992.

Après à la faillite de la société Eli Lilly après l'échec de l'étude PROWESS SHOCK à définir un effet bénéfique du traitement par la protéine C activée sur la mortalité suite à un choc septique [Ranieri *et al.* 2012], Didier Payen a obtenu les données de la cohorte PROWESS, ainsi que toutes les autorisations quant à leurs utilisations. Ce travail a donc été réalisé sur les données de la cohorte PROWESS [Bernard *et al.* 2001].

Outre le nombre de patient, ces données sont intéressantes car elles présentent une grande quantité d'information enregistrée pour ces patients. Il m'a donc été possible d'inclure des paramètres potentiellement confondant comme par exemple l'âge des patients et le genre.

Présentation des données de la cohorte PROWESS

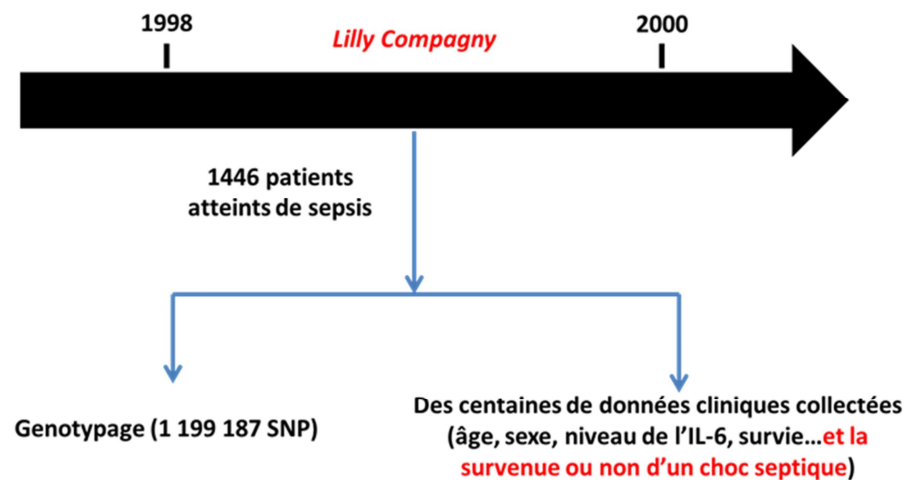


Figure 32 : Description globale des données de la cohorte PROWESS. Entre 1998 et 2000, la société Eli Lilly a collecté des données cliniques de patients entrant à l'hôpital pour causes de sepsis sévère. Ainsi, nous avons accès à des phénotypes et covariables tels que l'âge, le sexe, le niveau de l'IL6, la survie ou non des patients et la survenue ou non d'un choc septique. Ces collectes proviennent de 164 centres médicaux de 16 pays différents. Les 1446 patients ont été génotypés et ainsi il est possible d'accéder à 1 199 187 snp pour chaque individu.

Les données de la cohorte PROWESS (Figure 32) ont été enregistrées à partir de 1446 patients entrant à l'hôpital pour cause de sepsis sévère définit suivant une version modifiée du guide « American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine » (ACCP-SCCM) de 1992 [Bone *et al.* 1992]. Des caractéristiques cliniques, la présence de comorbidité, le niveau de l'IL-6 (pris comme marqueur de l'inflammation systémique) et l'information de la survenue ou non d'un choc septique nous sont ainsi accessibles.

Phénotypes et covariables

Des caractéristiques cliniques (l'âge, le genre), la présence de comorbidité (diabète, pancréatite, hypertension...) ainsi que le niveau de l'IL-6 dans le plasma (considéré comme marqueur de l'inflammation systémique) ont été enregistrés. Le niveau de cette cytokine pro-inflammatoire, mesuré à l'entrée des patients à l'hôpital, est normalisé par transformation en logarithme base 10. Nous avons aussi accès au score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment). Le phénotype choc septique est basé sur le score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment score), qui est utilisé pour suivre l'état d'un patient pendant son séjour dans une unité de soins intensifs. Il repose sur six scores différents, un pour chacune des voies respiratoires, cardiovasculaires, hépatiques, de la coagulation, du rein et des systèmes neurologiques.

Génotypage et sélection des patients et des SNPs

Les patients ont été génotypés et nous avons accès à 1 119 187 SNPs pour chacun d'entre eux [Bernard *et al.* 2001]. Brièvement, les échantillons d'ADN issus du sang de patient a été préamplifié *via* le kit « GenomePlex whole genome amplification » (Sigma-Aldrich ; St Louis, MO, USA). Le génotypage est réalisé à l'aide de la puce « Illumina Human 1M-Duo BeadChip ».

J'ai utilisé le package GenABEL, implémenté sous R [Aulchenko *et al.* 2007] pour l'étude d'association. Nous avons choisi un mode de transmission des allèles additif. Pour un trait binaire analysé seul (c'est-à-dire sans ajouter de covariable), cette méthode implémente un test de Cochran-Armitage. Globalement, le test consiste à calculer le carré de la corrélation entre le phénotype et la variable de test multiplié par le nombre de mesure. Sous l'hypothèse nulle, ce test est distribué selon une loi de χ^2 . Si le test comprend des covariables, le trait est analysé *via* une régression linéaire généralisée suivant un modèle logistique et les résidus ainsi calculés sont utilisés pour estimer le score du test pour chaque SNP. Ainsi la méthode retourne pour chaque polymorphisme une P-valeur d'association au phénotype étudié. Celle-ci est ensuite corrigée pour le facteur d'inflation lambda. Concernant les tests multiples, nous avons appliqué la méthode de correction du FDR (False Discovery Rate ; 5%) implémentée sous la librairie R *qvalue*.

A partir des 1 199 187 SNPs génotypés et des 1446 patients de départ, une première étape de contrôle qualité a été appliquée en utilisant la méthode « check.marker » de la suite de fonction GenABEL, implémentée sous R, pour contrôler le call rate des SNPs. Les polymorphismes avec une fréquence de l'allèle mineur inférieure à 1% et un taux de génotypage inférieur à 95%, ainsi que les individus dont le call rate est inférieur à 95%, sont exclus de l'analyse. Le nombre de SNPs et le nombre de patients restant suite à ce contrôle est de 948 573 et 1411 respectivement. Les individus ont ensuite été sélectionnés sur la base d'une analyse de stratification de la population par une analyse en composante principale (cmdscale ; librairie « stats » ; R) [R Development Core Team 2010]. J'ai utilisé la méthode de partitionnement du « Kmean » (stats ; R) [R Development Core Team 2010]. Trois clusters d'individus sont retournés, le plus grand d'entre eux contenant 1176 individus d'origine caucasienne. J'ai donc retenu ces individus pour la suite de l'analyse. Après avoir testé l'équilibre d'Hardy-Weinberg, 896 358 SNPs sont inclus dans l'analyse. Après ces étapes d'analyse, j'ai réévalué le taux de génotypage pour les individus en ne retenant que ceux passant le seuil de 95%. Au final, j'ai conduit l'analyse d'association avec 1173 individus et 896 358 SNPs. La figure 33 résume ces différentes étapes.

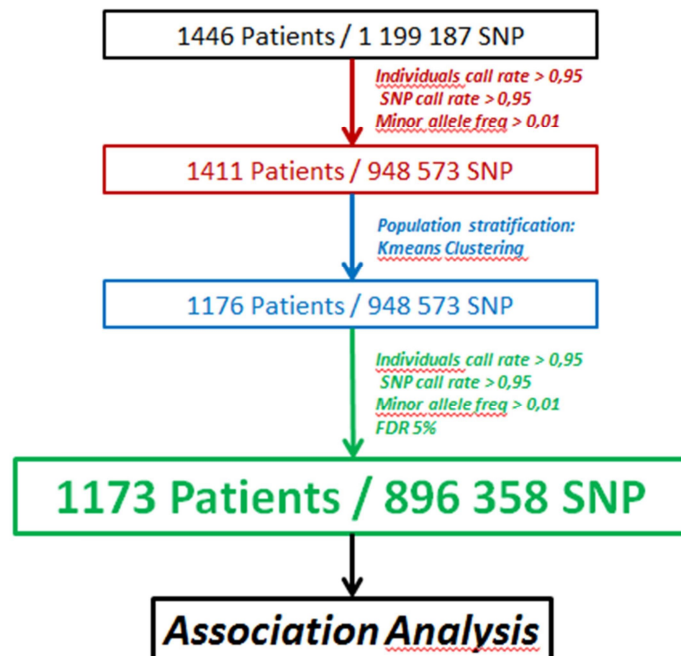


Figure 33: Représentation schématique de la sélection des patients et SNPs retenus pour l'analyse d'association.

Analyse d'association

J'ai réalisé une analyse en régression logistique pour estimer l'association des covariables avec le phénotype « choc septique ». Pour cela, j'ai utilisé la fonction glm de la librairie stats (R). Les covariables dont la Pvaleur, calculée par une analyse univariée, est inférieure à 0,2 sont retenus pour une analyse en régression logistique multivariée. Les covariables avec une Pvaleur inférieure ou égale à 0,05 sont retenues pour l'analyse d'association génétique. Les covariables retenues sont le genre, le score SOFA et le niveau de l'IL-6 (Tableau 3). Ainsi, le genre, le score SOFA et le niveau de l'IL-6 influencent le développement d'un choc septique chez les individus de cette étude.

Tableau 3 : Analyse d'association univariée et multivariée des covariables au phénotype « choc septique ».

Variable	Moyenne	Déviati on standard	Pvaleur (univariée)	Pvaleur (Multivariée)
Genre	-	-	0,05	0,000218
Age	61,700	16,396	0,00502	-
Hypertension	-	-	-	-
Infarctus du myocarde	-	-	-	-
Cardiomyopathie congestive	-	-	-	-
Diabète	-	-	-	-
Pancréatite	-	-	-	-
Maladie du foie	-	-	-	-
COPD	-	-	-	-
Cancer	-	-	0,0856	-
Score Apache II	24,720	7,629	1,27e-13	-
Score SOFA	7,570	7,570	< 2e-16	< 2e-16
Log(IL-6)	6,362	2,221	9,12e-16	0,018503

COPD = Chronic Obstructive Pulmonary Disease ; Apache II = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II.

Grâce à la librairie R GenABEL (v1.7-4) [Aulchenko *et al.* 2007], j'ai réalisé l'analyse d'association pangénomique. 12 SNPs sont retournés avec une Pvaleur significative (Pvaleur nominale (FDR 5%) = $6,5 \times 10^{-8}$) (Tableau 4).

Tableau 4 : SNPs associés au phénotype « choc septique » (qvalue = Pvalue ajustée FDR 5%)

	Chromosome	Position	Pvalue	qvalue
rs10225837	7	111518714	1.073976e-08	0.00962667
rs10487338	7	111507080	3.880383e-08	0.01284481
rs7179899	15	38857236	4.299000e-08	0.01284481
rs6803662	3	145103499	6.540898e-08	0.01465747
rs9451846	6	65276173	9.898001e-08	0.01774430
rs17017168	3	25905266	1.205707e-07	0.01801242
rs7175221	15	38865487	1.690410e-07	0.01950880
rs1561409	16	13149456	1.741161e-07	0.01950880
rs3730090	5	67624944	2.363398e-07	0.02270928
GA001388	1	170623060	2.533505e-07	0.02270928
rs10424424	19	21902059	6.322711e-07	0.04817220
rs7802845	7	111510724	6.449057e-07	0.04817220

Ma contribution dans ce travail s'est arrêtée là et la suite des analyses est poursuivie par un étudiant en thèse au laboratoire (Michel Sanka), qui va également analyser l'impact de dommage au rein sur le développement d'un choc septique.

II) Etude transcriptomique de patients atteints du syndrome de Sézary

SAHA (vorinostat) est un inhibiteur d'histone deacetylase (HDACi) pour le traitement de CTCLs (cutaneous T-cell lymphomas). SAHA altère l'expression des gènes induits par le facteur de transcription Sp1, nous avons étudié son association avec un antibiotique anti-cancer Mithramycin A (MTR, plicamycin), un inhibiteur compétitif de la fixation de Sp1 à l'ADN. Les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) de 4 patients atteints de ce syndrome ont été analysées quant à leurs sensibilités aux drogues (cytotoxicité) et leur réponse transcriptomique. Ma contribution dans ce travail a été de mettre en culture, avec Brigitte Khan-Perlès, les cellules de patient et, principalement, d'appliquer une régression linéaire multivariée pour identifier les gènes différentiellement exprimés en condition monotraitement (SAHA ou MTR) et en combinant les traitements (SAHA + MTR). J'ai également réalisé l'annotation fonctionnelle des gènes retrouvés comme différentiellement exprimés.

**Vorinostat and Mithramycin A in combination therapy as
interesting strategy for the treatment of Sézary T lymphoma:
Transcriptomic approach**

*Ragheb R.^{1 †}, Venton G.^{1, 2 †}, Chelbi R.², Bonnet N.³, Le Treut T.⁴, Poulin P.⁵, Beaufiles N.⁶,
Gabert J.⁶, Rihet P.¹, Loriod B.¹, Kahn-Perlès B.¹ and Costello RT.^{1, 2}*

¹ *Aix Marseille Université, INSERM UMR_S 1090, Technological Advances for Genomics and Clinics, 13288 Marseille-Luminy, France*

² *Aix Marseille Université, INSERM_U1104, CNRS UMR_7280, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, 13288 Marseille-Luminy, France*

³ *Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital Nord, Service de Dermatologie, 13915, Marseille, France*

⁴ *Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital Nord, Laboratoire d'Hématologie, 13915, Marseille, France*

⁵ *Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital La Conception, Service d'Hémaphérèse, 13005, Marseille, France*

⁶ *Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Hôpital Nord, Laboratoire de Biochimie Biologie Moléculaire, 13288, Marseille, France*

⁷ *Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Hôpital de la Conception, Service d'Hématologie, 13005, Marseille, France*

[†] *Equal contributors*

Corresponding author: Régis Costello, Email: regiscostello.tagc@gmail.com

Abstract

Objectif: SAHA (vorinostat) is an histone deacetylases inhibitor (HDACi) approved by the USA Food and Drug Administration (FDA) for treating advanced refractory cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs). As SAHA alters the expression of many genes under control of the Sp1 transcription factor, we examined the effect of its association with the FDA-approved anticancer antibiotic Mithramycin A (MTR, plicamycin), a competitive inhibitor of Sp1 binding to DNA.

Methods: Sézary syndrome (SS) cells, expanded *ex vivo* from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 4 patients, were tested for their sensitivity to the drugs regarding cytotoxicity and differential responsive genes expression. Multivariate statistical methods were used to identify genes whose expression is altered by SAHA, MTR, and the two drugs in combination.

Results: MTR, like SAHA, induced the apoptosis of SS cells, while the two drugs in combination showed clear synergy or potentiation. Expression data stressed a likely important role of additive or synergistic epigenetic modifications in the combined effect of the two drugs, while direct inhibition of Sp1-dependent transcription seemed to have only limited impact. Ontological analysis of modified gene expression suggested that the two drugs, either independently or synergistically, counteracted many intertwined pro-survival pathways deregulated in SS cells, resistance of these tumors to intrinsic and extrinsic apoptosis, abnormal adhesion migration and invasive properties, as well as immunosuppressive behavior.

Conclusions: Our findings provide preliminary clues on the individual and combined effects of SAHA and MTR in SS cells and highlight a potential therapeutic interest of this novel pair of drugs for treatment of SS patients.

Keywords

Sézary Syndrome; SAHA; Mithramycin A; Synergistic apoptosis; Gene expression profiling

Abbreviations

SAHA, Suberoylanilide hydroxamic acid; MTR, Mithramycin A; CI, combination index; CTCL, cutaneous T-cell lymphomas; FC, fold change; FDR, false discovery rate; GO, gene ontology; Sp1, specificity protein 1; SS, Sézary syndrome.

Introduction

Sézary syndrome (SS) is an aggressive epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) defined by the triad of erythroderma, generalized lymphadenopathy and the presence of clonally related neoplastic T-cells with cerebriform nuclei (Sézary cells) in skin, lymph nodes and peripheral blood (PB) (more than 1G/L lymphoma cells in PB, an expanded CD4⁺ T cell population resulting in a CD4/CD8 ratio of more than 10 and/or loss of one or more T-cell antigen) [1]. SS cells show a clonal rearrangement of T cell receptor (TCR), have evolved towards T helper 2 (Th2) phenotype resulting in increased production of interleukin IL-4, IL-5 and IL-10 [2], have a central-memory profile (L-selectin/CD62L⁺) which distinguishes it from that of mycosis fungoïde (MF) CTCL sub-type [3], and display a Treg phenotype with a suppressive function in a substantial number of patients [4]. Despite the variety of therapeutic treatments that are presently offered to Sézary patients, none of them is curative and their goal is to maintain a long-term response and preserve life quality. Improved therapy deserves a better knowledge of the pathogenic mechanisms underlying the SS syndrome and of the mechanisms associated to the resistance to treatments. Microarray-based and RNA-Seq gene expression profiling of SS cells have identified and validated candidate genes as novel diagnostic markers and putative therapeutic targets [5].

Histone deacetylase inhibitors (HDACis) are recent anti-cancer drugs showing efficacy in hematologic and solid cancer. They can induce tumor cell death, cell cycle arrest and/or differentiation mostly by transcription-dependant mechanisms leading to the accumulation of acetylated histones and non-histone proteins. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat, marketed as Zolinza®), is a pan-HDAC inhibitor which causes growth arrest as well as caspase-dependent apoptotic and caspase-independent autophagic cell death [6] in a great variety of tumor types. An overall response rate of 29.7 % has been reported in refractory CTCL, which led to the approval of this drug by the USA Food and Drug Administration (FDA) for these pathologies [7]. These compounds need to be combined to other anti-cancer agents to increase their efficacy in CTCLs. A recent gene expression profiling performed following SAHA treatment of several CTCL lines has underlined the potential benefit of combining this agent to inhibitors targeting PI3K [8]. Moreover, a case study on refractory SS reported significant clinical improvement following treatment with SAHA combined to interferon gamma [9].

In our study we hypothesized that the efficacy of SAHA should be increased by combining it with a drug that acts directly on its transcriptional regulatory properties. As with several other HDACis, SAHA modifies the expression of many genes under control of Sp1 (or Sp3) transcription factors via distinct gene- and cellular context-dependent mechanisms. SAHA induces a repression of survival genes [10] and expression of anti-

neoplastic genes [11]. However, reports have indicated that SAHA could also induce the expression of some key survival genes under control of Sp1[12]. Given that similar modulations could limit the effectiveness of SAHA in SS, we tested here its association with the anticancer antibiotic Mithramycin (Plicamycin, MTR, marketed as Mithracyn®) a direct inhibitor of the binding of Sp1 family factors to GC-rich promoters [13]. We report that MTR, similarly to SAHA, induced the apoptotic death of SS cells. The two drugs clearly demonstrated a synergistic effect that could even overcome the resistance to MTR used in monotherapy. This finding is of putative major clinical interest since it could allow the inhibition of the development of chemotherapy-resistant clones during treatment, may offer second or third line treatment to relapsed patients, and minimize the deleterious dose-dependent effect of each drug used as monotherapy. Moreover, using whole genome expression profiling, we provide some clues on the molecular mechanisms underlying the lethal effect of the two drugs and their synergistic behavior.

Methods

Cells and culture conditions

PBMCs were collected from 4 SS patients following informed written consent and approval of the study by the “Comité de Protection des Personnes” (CPP) Sud-Méditerranée II. Patient characteristics and flow cytometry (FC) immunophenotypic data (FACS Navios cytometer/Beckman Coulter, Miami Florida, USA) of the samples are detailed in **Supplementary Data, Table S1**. FC analysis of TCR V β expression was assessed by using a panel of 24 monoclonal antibodies known to react with specific TCR-V β families according to the manufacturer’s recommendations (IOTest Beta Mark TCR-V β Repertoire Kit; Beckman Coulter). The high percentage of T lymphocytes (over 70 % of white blood cell count) and the great majority of CD4⁺ among these (around 90 %) led us to put samples in culture without prior purification. SS cells were expanded for seven days in RPMI medium supplemented with 10 % FCS, in the presence of recombinant IL-7 (10 ng/ml, Bio Basic Inc., Ontario, Canada) and anti-CD28 (monoclonal antibody 248 ascites from Dr. A. Moretta, Genova provided to us by Dr. D. Olive, Marseille) according to culture conditions reported in the literature [14].

Cell treatments and assessment of synergy

SAHA was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), MTR from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 7-AAD and Annexin V-APC from BD Pharmingen (France). Patient cells were treated with increasing doses of SAHA or MTR and the ED50 of each drug was determined as the dose of treatment inducing 50 % apoptosis after 48 hours. Viable and apoptotic cells were identified by flow cytometry (BD FACSCalibur) as annexin V⁻/7-AAD⁻ and annexin V⁺/7-AAD^{- or +}, respectively. Combined effects of SAHA plus MTR were determined according to the method of Chou and Talalay [15] that assesses first the apoptotic response of cells to fractionated cascade doses of the ED50 of each drug (alone or in combination), and second, the combination index (CI) deduced from dose-response curves (Calculusyn software, Biosoft, Cambridge, GB). The method of Chou and Talalay permits to determine the dose reduction index (DRI) that represents the order of magnitude (fold) of dose reduction that is allowed for a given degree of effect compared with the drug alone.

Microarray processing (RNA isolation, amplification and hybridization)

RNA extraction was performed with RNeasy® mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). On-column digestion of DNA was done during RNA purification with RNase-free DNase set (Qiagen GmbH). Quantification of RNA was achieved using NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and the quality of the RNA samples RNA (Integrity Number over 8) was analyzed with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®, massy, France) used with Agilent chips (RNA Nano Chip®). Samples and microarrays were processed according to Agilent's recommendations. In brief, total RNA was reverse-transcribed with AffinityScript RT enzyme and cDNA was *in vitro* transcribed and mono-labeled using T7 RNA polymerase and Cy3-CTP, before fragmentation of cRNA and hybridization (600 ng per sample/17 h/65 °C) to a SurePrint G3 Human GE 8x60k microarray. After washing the microarrays were scanned with SureScan Agilent Microarray Scanner.

SAHA and MTR synergistic, potentiating or antagonistic effects determination

Synergistic, potentiating or antagonistic effects were deduced from the values of fold changes (FC) according to the following pharmacological standards: additive effects for FCSAHA+MTR = FCSAHA + FCMTR; synergistic effects for FCSAHA:MTR > FCSAHA + FCMTR; potentiation by MTR for FCSAHA:MTR > FCSAHA with no effect of MTR alone; potentiation by SAHA for FCSAHA:MTR > FCMTR with no effect of SAHA alone and antagonism for FCSAHA:MTR < FCSAHA plus FCMTR.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Expression levels of twelve genes were analyzed using real-time quantitative PCR as a validation of microarray results. Reverse transcription was performed with 500ng of total RNA and 200 UI MMLV Reverse Transcriptase (Life Technologies, France) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed using TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies) for *CAMK2N2* (Hs00536421_m1), *DACT3* (Hs00376818_m1), *FERMT3* (Hs01075695_m1), *KDM4B* (Hs00943639_m1), *PREX1* (Hs0036807_m1), *NCOR2* (Hs00196955_m1), *GRK5* (Hs00992173_m1), *BAMBI* (Hs03044164_m1), *DLK2* (Hs01106587_m1), *NGFR* (Hs00609977_m1), *SLC4A11* (Hs00984689_m1), *CORO1A* (Hs00200039_m1) and *TBP* (Hs00427620_m1). All real-time PCR reactions were performed using the MX3000P detection system (Life Technologies) and the amplifications were done using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies). Experiments were carried out in duplicate for each data point. The relative quantification in gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [16] and fold changes (FC) in gene expression were normalized to *TBP* internal control and relative to untreated control condition (calibrator).

Results

Synergistic cell death induced by SAHA plus MTR combination in SS tumor cells

The cell-death-inducing effects of single agent SAHA or MTR was studied in primary tumor cells from four SS patients (P1 to P4) (**characteristics in Supplementary Data, Table S1**). Dose-response survival curves to a 48 hours treatment are shown in **Figure 1a and b**. Cell death occurred mainly by apoptosis since, in all conditions, >70% of the non-viable cells bound the apoptotic indicator annexin-V (not shown). The sensitivity to the drugs was variable, cells from P3 and P4 being hardly and highly sensitive to MTR, respectively. Cells from the four patients were treated with serial dilutions of each drug individually and with both drug simultaneously at a fixed ratio of doses that corresponded to 1/2, 1, 1 1/2, 2 and 2 1/2 the individual ED50 obtained for P2 cells (i.e. 4.05 μ M and 328 nM for SAHA and MTR, respectively) that display an average sensitivity (**Figure 1**). **Figure 2** shows fractional survival dose-response curves from at least three independent experiments. For P3 cells, the combined treatment overcame the insensitivity to MTR used as single agent. The ED50 of each drug used in combination was extrapolated from the equation of the combined response-curves and corresponded to 4/9, 2/3, 3/4 and 1/3 of the ED50 of the drugs used in mono-treatments for P1, P2, P3 and P4, respectively. As shown in **Table 1** and **Supplementary Data, Figure S1**, SAHA and MTR displayed a clear synergistic behavior for cells

of four patients indicated by CI values below 1. DRI values of SAHA and MTR, which are a useful indicator of potential clinical benefit (**Supplementary Data, Table S2**), were much greater than 1 for all the patients at doses affecting over 80 percent of the cells, reflecting a sharp decrease in combined treatment doses required compared to single-treatments. The extreme positive values of DRIs obtained for MTR-treated P3 cells reflect their insensitivity to the drug when used alone.

Delineation and characteristics of subsets of genes differentially responsive to SAHA and/or MTR

To identify genes whose expression was differentially altered by SAHA and/or MTR treatments, we performed a gene expression profiling in cell samples from the four patients. We treated these with doses of drugs corresponding to the ED50 obtained for the combined treatment of cells from P2, i.e. 2.7 μ M and 219 nM for SAHA and MTR, respectively. Given the high death response of cells from patient 4, the length of treatment was reduced to 24 hours for all the patients. After multivariate analyse, genes whose expression was influenced by SAHA or MTR mono-treatments and SAHA plus MTR combined treatment have been listed according to their response to the drugs and their up- or down-regulation in **Supplementary Data, Table S3**. Among a total of 2399 selected genes, the vast majority responded differentially to either SAHA or MTR mono-treatments in about equal proportion, i.e. 51.1 % for SAHA (1226 genes) and 45.4 % for MTR (1090 genes), while only a few genes differentially responded to the combined treatment, i.e. 3.5 % (83 genes). In each of the three subsets, similar proportions of genes were up- and down-regulated, i.e.: 46.4 % (569 genes) and 53.6 % (657 genes) respectively for SAHA, 48.4 % (528 genes) and 51.6 % (562 genes) respectively for MTR and 59 % (49 genes) and 41 % (34 genes) respectively for SAHA plus MTR. The genes were classified similarly for the four patients as illustrated by dendrograms and heat map representation of their hierarchical clustering (**Figures 3 and 4**). The two Venn diagram representations of the overlap between the three subsets of up-or down-regulated genes (**Figure 5**) show that most of the genes responding to either mono-treatments did it exclusively, while a minor subset of genes responded independently to both drugs (noted as SAHA and MTR). Among the genes that differentially responded to the combined treatment (noted as SAHA:MTR), nearly half did so exclusively, while the remaining genes already responded to mono-treatments by SAHA and/or MTR. The lists of genes corresponding to the different subgroups are reported in **Supplementary Data, Table S4**. SAHA:MTR responsive genes were further classified according to the synergistic, potentiating or antagonistic effects of the two drugs on their expression.

As shown in **Supplementary Data, Table S5**, the expression of a large proportion of SAHA:MTR responsive genes was modulated synergistically or potentiated by MTR, while that of smaller proportion was modulated antagonistically. The transcriptional response of representative genes belonging to each of the subsets delineated by the Venn diagram have been illustrated by box plots (**Supplementary Data, Figure S2**).

Modulation of Sp factors transcriptional activity by SAHA and/or MTR

SAHA mediates some of its effect via the modulation of Sp1 (or Sp3) transcriptional activity and MTR is a DNA-binding compound which can directly inhibit the binding of Sp factors to GC-rich promoter motifs. To evaluate to which extent those direct mechanisms might contribute to the expression of the genes responsive to SAHA:MTR, we screened these for enrichment of Sp1 DNA binding motifs in widening the screening to the sets of genes differentially responsive to SAHA or MTR mono-treatments (**Supplementary Data, Table S3**). We found that Sp1 motifs ranked first (corrected Benjamini P value: 3.50-18), for around a third of the genes up-regulated by SAHA (i.e. 191/528 genes). A similar result was obtained using Distant Regulatory Elements (DIRE) search tool [17]. When cross-checking the latter subset of genes with the genes responsive to SAHA:MTR, we found a minor overlap of seven up-regulated genes, i.e. CDC42EP2, SH2B2, CNFN, DLK2, MAP1A, NGFR and TNFRSF12A (**Supplementary Data, Table S6**) that might thus represent direct targets of Sp1 (or Sp3). Interestingly, except for SH2B2, all these genes belonged to the subset of genes potentiated by MTR (**Supplementary Data, Table S5**). No enrichment of Sp1 motifs was found for SAHA down-regulated genes and for MTR up- and down-regulated ones.

Most significant genes and processes differentially targeted by SAHA

Gene ontology (GO) enrichment analysis identified nucleosome as the only significant term associated with SAHA up-regulated genes (**Table 2**). It encompasses fifteen histone genes, among which H1F0 was first-ranked (**Supplementary Data, Table S7**). A thorough examination of the function of the most strongly up-regulated genes (**Supplementary Data, Table S3**) indicated that many of them were related to cancer and encoded various effectors of signal transduction, cell cycle and transcriptional regulation (**Table 3a** and **Supplementary Data, Table S8** for details on their behavior) The highest FC (>13) were obtained for three tumor suppressors, i.e. CAMK2N2 (alias CAM-KIIN); DACT3 (alias DAPPER3) and CDKN1C (alias p57Kip2).

GO enrichment analysis on genes down regulated in response to SAHA showed that their belonged to several biological processes and pathways altered by the drug in SS cells (**Table 2** and **Supplementary Data, Table S7** for details on genes). The drug decreased the expression of many major positive regulators and effectors of leukocyte activation such as CD3D, CD2, LCP2, LAT, LCK and ZAP70. We also found that it decreased the expression of DOK2, PSTPIP1 (alias CD2BP1), MAP4K1 (alias HPK1) and PTPN7 (alias HePTP) involved in negative feedback loops. Several members of the Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) signaling pathway were also decreased such as JAK3, STAT6, STAT5A, STAT5B, NMI, IL2RG and IL27RA, as well as several critical negative regulators of apoptosis like IRAK1, CARD8 (alias CARDINAL or TUCAN), AVEN, TNFSF12 (alias TWEAK), CASP4, FAIM and CASP5 (**Supplementary Data, Table S7**). The collapse of pro-inflammatory pathways was evidenced by the decreased expression of TLR1, MYD88, PYDC1, PYCARD (alias ASC), CARD6, TRIP6, XIAP, HDAC7 and MAPK13 (alias p38delta). Finally, more genes, unclassified in GO terms and known as related to cancer, also figured among the most significant down-regulated genes, as PTPN7 (alias HePTP), PTPRCAP (alias CD-45-AP), FUT7, FMNL1, ICAM3, CDKL1 and PSMB10 (alias LMP10) (**Table 3a** and **Supplementary Data, Table S8** for details on the top-ranked genes).

Most significant genes and cell processes targeted by MTR

GO enrichment analysis did not identify significant term for MTR up-regulated genes. Markedly, a high proportion of the latter (110/528 i.e. around 21 %) encoded long non-coding RNAs (LncRNAs), while this proportion was much lower among the down-regulated genes (15/562 i.e. around 2.7 %), or among any other cluster of drug-responsive genes (**Supplementary Data, Table S3**). Of note too, *SNHG1*, which encodes small nucleolar RNAs (snoRNA) described as diagnostic and prognostic marker in peripheral T-cell lymphoma, was among the top-ranked genes up-regulated by MTR. (**Table 3a** and **Supplementary Data, Table S8** for details on the genes).

MTR down-regulated genes were classified into many significant GO terms and KEGG pathways (**Table 2, and Supplementary Data, Table S7**). As for SAHA targets, “GTPase regulator activity” and “pleckstrin homology” were enriched. The great majority of the genes included in the above two GO terms were exclusive targets of each drug (**Table S7**). MTR selectively down-regulated genes encoding GEFs (*PREX1*, *ELMO1*, *RAPGEF1*, *TRIO* and *VAV2*) and GAPs (*MYO9B*, *SIPA1L1*, *RASA3* and *ASAP1*), the Rho GTPase *ARHGAP26*, the G-coupled protein kinase *ADRBK2* (alias *GRK3*), the intracellular trafficking regulator *DNM2* (alias *DYN2*) the actin binding protein *SWAP70*, the oncogenic kinase *MAP4K4*, the T cell motility regulator *SKAPI* (alias

SKAP55) and the autophagy regulator *TBC1D5*. Additional targets of MTR connected to cell motility, adhesion and invasiveness were found in other related GO-terms and KEGG pathways, like *GRK5*, *GRK6*, *CHST11*, *CAMK1D*, *CASK*, *ACTR3*, *DISC1*, *FUT8*, *FNBP1*, *BOPI*, *PAK1*, *CCR1* and *CXCR3* (**Table S7**). The drug also decreased the expression of many genes encoding positive effectors of proliferative and survival pathways like *BLK* and *PLCG2* (BCR signaling), *LRBA* (EGFR signaling), *RPTOR*, *GNB1*, *PRKCA* and *PRKCB* (mTOR signaling) and *TBL1X* (β -catenin and NF- κ B transcriptional activity), as well as *GRB2*, *GRAP*, *GRAP2* and *SH2B3* encoding signal adaptors. Moreover, MTR down-regulated a number of members of the mitogen-activated protein (MAP) kinases signaling cascade as *MAP2K5*, *MAP3K5*, *MAP4K4*, *MAPK1*, *MAP2K2* and *MAP2K3*. (**Table 3a** and **Supplementary Data, Table S8**).

Most significant genes and cell processes targeted by SAHA plus MTR combined treatment

We examined the function of the genes whose expression was either synergized or potentiated (**Supplementary Data, Table S5**). Many of these genes were implicated in cancer and/or T cell functions (**Table 3b** and **Supplementary Data, Table S9** for details). Several tumor suppressors figured out among the up-regulated ones, as *EIF4EBP1* (alias *4E-BP1*), *NPTX1*, *DLK2*, *NGFR* (alias *p75NTR*), *CDC42EP2* (alias *BORG1*) and *BIK*. The upregulation of some oncogenes was found too, as *FGF22*, *FGFR3*, *SLC22A17*, *TNFRSF12A* (alias *FNI4*) and *MAPIA*. Some oncogenes implicated in signal transduction were among the down-regulated genes, as *FBLN5* (alias *DANCE*), *B3GALT4* and *PPP1R10* (alias *PNUTS*). The expression of three genes encoding transcriptional regulators was also decreased, namely *TADA3* (alias *hADA3*), *PBX2* and *ADAR*. SAHA:MTR interaction also induced a diminution in the expression of two members of the antigen processing and presenting machinery (APM) of class I molecules, i.e. *TAP1* (alias *ABCB2*) and *PSMB8* (alias *LMP7*). Finally, the examination of the set of genes whose expression was antagonized by the combined treatment (**Table 3b** and **Supplementary Data, Table S9**) indicated that, for the vast majority of them, the upward or downward trends of their response to single treatments was not inverted by SAHA:MTR interaction (**Supplementary Data, Table S5**).

Validation of expression profiles of selected genes by quantitative real-time polymerase chain reaction

To verify the accuracy of changes in gene expression deduced from the above transcriptomic analyses, selected genes were assayed by RT-qPCR from relevant mRNA extracts used for the microarrays. These corresponded to cells from three of the four patients, three biological replicates and four treatment conditions, i.e. no drug for all

the genes, SAHA for CAMK2N2, DACT3, and FERMT3, MTR for KDM4B, PREX1, NCOR2 and GRK5 and SAHA plus MTR for BAMBI, DLK2, NGFR SLC4A11 and CORO1A. We found that the direction of changes obtained by RT-qPCR (**Table 4**) was in agreement with that deduced from the arrays for all the genes (**Supplementary Data, Table S3**).

Discussion

Extensive transcriptional modifications rather than gene mutations seem to account for the cellular deregulations that cause the abnormal immunological behavior, the high capacity for survival and resistance to apoptosis, and the skin homing and migratory properties of SS cells. We thus tested the *ex vivo* killing efficiency of the association of SAHA and MTR that broadly targets transcription. Importantly, we found that this drug combination had a synergistic or potentiating effect on the killing of primary cells from four SS patients. Our transcriptomic analysis of the differential responses of genes to mono or combined treatments showed highly significant changes of expression that provided putative clues on some transcriptional mechanisms that may underlie the combined effects of SAHA plus MTR, as well as on some key deregulated pathways targeted by the drugs.

A minor subset of seven genes differentially responsive to SAHA:MTR interaction was enriched in Sp1 regulatory sequences. Markedly, the expression of six of these genes (CDC42EP2, CNFN, DLK2, MAP1A, NGFR and TNFRSF12A) was potentiated by MTR, suggesting that the two drugs cooperate to release a repressive binding of Sp1 (or Sp3). In favor of this, functional Sp1 binding sites were previously identified for the majority of the latter genes [18] [19] [20] [21] and an Sp1-containing repression complex recruiting HDAC1 was detected on the NGFR promoter [18]. However, an overall limited direct role for Sp1 (or Sp3) should be envisaged in the mechanism of interaction of the two drugs, given the lack of global enrichment for Sp1 motifs among SAHA down-regulated genes and among total MTR-regulated ones. This is not unexpected considering the many acetylated targets of SAHA and the fact that MTR, although commonly viewed as an inhibitor of Sp1, also behaves as a broader epigenetic drug by directly binding to histones thus inducing deleterious epigenetic modifications [22]. Our data indicate that MTR down-regulated the expression of many genes playing a key role in epigenetic regulation as DNMT1, several genes encoding transcription cofactors implicated in histone modifications (histone-lysine demethylases and methyltransferases, and histone deacetylase), in ATP-dependent chromatin remodeling and in gene co-activation and co-repression. Thus, similar to HDAC inhibitors, MTR may

indirectly induce broad alterations of gene expression. For example, DNMT1 suppression should induce the re-expression of a large set of transcripts under control of DNA methylation, ranging from coding genes to microRNAs and LncRNAs non coding RNA. MTR selectively up-regulated a large proportion of LncRNAs, a striking observation in view of the recent identification of Sézary cell-associated LncRNAs [23]. In light of the several reports showing crosstalk between histone deacetylases and lysine-specific demethylases or DNA methyl transferases, SAHA and MTR may exert a synergical activity in part via their epigenetic-targeted modifications.

As summarized in Figure 6, SAHA and MTR as combination therapy may be an interesting therapeutic option in the treatment of CTCL. Such association should, in theory, be an effective therapeutic against the main pathways involved in carcinogenesis and tumor progression of the CTCL.

Counteract intertwined growth and survival pathways in SS cells

Basal activation of the JAK/STAT pathway, involved in IL-2 receptor (IL-2R) signaling and constitutive phosphorylations of STAT5 and STAT3 transcription factors, are reported in CTCL lines [24]. In addition STAT proteins are frequently overexpressed in Sézary patient cells due to a duplication at 17q11.2 [25]. SAHA repressed the expression of many genes coding for direct effectors of JAK-STAT signaling. The drug did not however act on the transcription of STAT3, or on that of its partner JAK2 but our data suggest that it could, together with MTR, counteract some of the constitutive phosphorylations of STAT3 via the inhibition of Notch1 and PI3K/Akt/mTOR pathways.

Aberrant perinuclear cytoplasmic accumulation of the proto-oncogene β -catenin is found in 70 percent of SS samples, suggesting an important role for this protein in the development of skin lymphomas [26]. SAHA strongly increased the expression of *DACT3* (alias *DAPPER3*) encoding an antagonist epigenetic regulator of Wnt/ β -catenin signaling. MTR down-regulated *JAKMIP1* encoding a protein highly expressed in tumor tissues that may activate Wnt signaling, potentiate β -catenin accumulation and enhance proliferation. Last, SAHA:MTR interaction synergistically decreased the expression of *TADA3* that encodes a histone acetyl transferase (HAT) complex member playing a role in β -catenin activation and target gene selectivity. SAHA plus MTR combination may thus counteract Wnt/ β -catenin signaling.

Overcome the resistance of SS cells to apoptosis

SS cells low proliferative potential and accumulation is likely to result from a defective regulation of intrinsic [24] and extrinsic [27] [28] apoptosis pathways. Our findings strengthen the notion of a major impact of SAHA on the intrinsic death pathway [8] with the yet non described down-regulation of AVEN and CARD8 (alias TUCAN or CARDINAL) encoding respectively direct inhibitors of the formation and of the activity of the apoptosome, of XIAP (alias BIRC4) encoding a member of the Inhibitor of Apoptosis (IAP) family that inhibits caspase 9 activity, of FAIM encoding an inhibitor of XIAP ubiquitinylation and degradation, as well as the upregulation of CRIP2 encoding a putative transcriptional activator of CASP3 and CASP9. SAHA may also activate the extrinsic pathway by decreasing the expression of TRIP6 encoding an antagonist of Fas/CD95-induced apoptosis.

Neutralize SS cells adhesion, invasion and migration

An abnormally high expression of several chemokine receptors and of the adhesion molecule L-selectin (CD62L) was found in the majority of SS cells correlating with their central memory cell origin and with epidermotropism and lymphadenopathy[29] [30]. Markedly, MTR decreased CCR1, SAHA decreased SELL (CD62L) and both drugs independently decreased CXCR3. MTR should thus impede SS cells skin homing [31]by decreasing the expression of the three critical Rac activators PREX1 (alias P-Rex1), DOCK2 and ELMO1 that transduce CXCL12-CXCR4 signaling. The overexpression of β 1 integrin T cell homing protein also has a high predictive power to classify SS patients [32], and was potently inhibited by SAHA plus MTR treatment. Our data strongly suggest that SAHA and MTR combination may counteract the invasive and migratory behavior of SS cells.

Abolish SS cells immuno-regulatory properties

SS cells from some patients show features of Th2 and Tregs T lymphocytes in secreting IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β immunosuppressive cytokines and expressing FOXP3 transcription factor, likely contributing to suppression of the host cellular immunity [4]. Given that the expression of IL-10, TGF- β and FOXP3 relies on JAK/STAT signaling, treating SS cells with SAHA that profoundly alters this pathway should counteract some of SS cells suppressive functions.

In conclusion, our study provide mechanistic clues on the individual and combined action of SAHA and MTR in SS cells, which seems to rely on complementary or synergistic hampering of most of the survival and apoptotic processes currently known to be deregulated in these tumors. Gene targets of presumed importance were identified and deserve future functional validations. Some of these suggest in turn novel basal deregulations of SS cells and, as such, might in the future provide new markers for diagnosis and prognosis. Our results also emphasize the therapeutic interest of combining two epigenetic drugs which are probably interacting largely via additive or synergistic DNA and histone modifications. Lastly, they also point at some possibly detrimental side effects of this drug combination such as the weakening of tumor immunogenicity.

Availability of supporting data

The microarray data included in the paper have been deposited under embargo in GEO to be released upon acceptance of the paper for publication at: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=glypyyownjmtntp&acc=GSE64119>)

Competing interests

The authors have no conflicts of interest to declare and no financial interests to report.

Authors's contribution

BKP and RTC initiated the Sézary project and RTC supervised hospital collaborations. PP supplied characterized PBMC samples from SS patients. BKP conceived the experiments, BKP, BL, JG and NB (Beaufils) designed the experiments and BKP, BL, NB (Beaufils), NB (Bonnet), RC and TLT carried out the experiments. PR designed the statistical analyzes of μ array data and RC and RR carried out the bioinformatic analyses. BKP carried out the interpretation of the analyses and drafted the article. PR, RR, VG and RTC corrected the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the French National Research Agency (ANR-08-SYSC-003 CALAMAR). We thank Ms L. Borg for expert supervision of Marseille Luminy cell culture facilities, Dr. J. Imbert (TAGC), Dr. A. Bergon and Mr Nicolas Fernandez (transcriptomic and Genomic Marseille-Luminy TGML/TAGC platform) for their helpful advice for the preparation of the manuscript.

References

- [1] E. Campo, S.H. Swerdlow, N.L. Harris, S. Pileri, H. Stein, E.S. Jaffe, The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications, *Blood*. 117 (2011) 5019–5032. doi:10.1182/blood-2011-01-293050.
- [2] E.J. Kim, S. Hess, S.K. Richardson, S. Newton, L.C. Showe, B.M. Benoit, R. Ubriani, C.C. Vittorio, J.M. Junkins-Hopkins, M. Wysocka, A.H. Rook, Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 798–812. doi:10.1172/JCI24826.
- [3] J.J. Campbell, R.A. Clark, R. Watanabe, T.S. Kupper, Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors, *Blood*. 116 (2010) 767–771. doi:10.1182/blood-2009-11-251926.
- [4] T. Krejsgaard, N. Odum, C. Geisler, M.A. Wasik, A. Woetmann, Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sézary syndrome, *Leukemia*. 26 (2012) 424–432. doi:10.1038/leu.2011.237.
- [5] R. Costello, C. Sanchez, T. Le Treut, P. Rihet, J. Imbert, G. Sébahoun, Peripheral T-cell lymphoma gene expression profiling and potential therapeutic exploitations, *Br. J. Haematol.* 150 (2010) 21–27. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07977.x.
- [6] Y. Shao, Z. Gao, P.A. Marks, X. Jiang, Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 18030–18035. doi:10.1073/pnas.0408345102.
- [7] M. Duvic, J. Vu, Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma, *Expert Opin. Investig. Drugs*. 16 (2007) 1111–1120. doi:10.1517/13543784.16.7.1111.
- [8] M.B. Wozniak, R. Villuendas, J.R. Bischoff, C.B. Aparicio, J.F. Martínez Leal, P. de La Cueva, M.E. Rodriguez, B. Herreros, D. Martin-Perez, M.I. Longo, M. Herrera, M.A. Piris, P.L. Ortiz-Romero, Vorinostat interferes with the signaling transduction pathway of T-cell receptor and synergizes with phosphoinositide-3 kinase inhibitors in cutaneous T-cell lymphoma, *Haematologica*. 95 (2010) 613–621. doi:10.3324/haematol.2009.013870.
- [9] J.M. Gardner, C.E. Introcaso, S.D. Nasta, E.J. Kim, C.C. Vittorio, A.H. Rook, A novel regimen of vorinostat with interferon gamma for refractory Sézary syndrome, *J. Am. Acad. Dermatol.* 61 (2009) 112–116. doi:10.1016/j.jaad.2008.11.889.
- [10] L. Huang, Y. Sowa, T. Sakai, A.B. Pardee, Activation of the p21WAF1/CIP1 promoter independent of p53 by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) through the Sp1 sites, *Oncogene*. 19 (2000) 5712–5719. doi:10.1038/sj.onc.1203963.
- [11] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211.
- [12] S.-N. Kim, N.H. Kim, W. Lee, D.-W. Seo, Y.K. Kim, Histone deacetylase inhibitor induction of P-glycoprotein transcription requires both histone deacetylase 1 dissociation and recruitment of

CAAT/enhancer binding protein beta and pCAF to the promoter region, *Mol. Cancer Res. MCR.* 7 (2009) 735–744. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0296.

[13] S.W. Blume, R.C. Snyder, R. Ray, S. Thomas, C.A. Koller, D.M. Miller, Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo, *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 1613–1621. doi:10.1172/JCI115474.

[14] A. Dalloul, L. Laroche, M. Bagot, M.D. Mossalayi, C. Fourcade, D.J. Thacker, D.E. Hogge, H. Merle-Béral, P. Debré, C. Schmitt, Interleukin-7 is a growth factor for Sézary lymphoma cells, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 1054–1060. doi:10.1172/JCI115920.

[15] T.-C. Chou, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 621–681. doi:10.1124/pr.58.3.10.

[16] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods San Diego Calif.* 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

[17] V. Gotea, I. Ovcharenko, DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W133-139. doi:10.1093/nar/gkn300.

[18] N. Iraci, D. Diolaiti, A. Papa, A. Porro, E. Valli, S. Gherardi, S. Herold, M. Eilers, R. Bernardoni, G. Della Valle, G. Perini, A SP1/MIZ1/MYCN repression complex recruits HDAC1 at the TRKA and p75NTR promoters and affects neuroblastoma malignancy by inhibiting the cell response to NGF, *Cancer Res.* 71 (2011) 404–412. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2627.

[19] A. Nakayama, T. Odajima, H. Murakami, N. Mori, M. Takahashi, Characterization of two promoters that regulate alternative transcripts in the microtubule-associated protein (MAP) 1A gene, *Biochim. Biophys. Acta.* 1518 (2001) 260–266.

[20] S. Rivero, A. Ruiz-García, M.J.M. Díaz-Guerra, J. Laborda, J.J. García-Ramírez, Characterization of a proximal Sp1 response element in the mouse Dlk2 gene promoter, *BMC Mol. Biol.* 12 (2011) 52. doi:10.1186/1471-2199-12-52.

[21] M.M. Tajrishi, J. Shin, M. Hetman, A. Kumar, DNA methyltransferase 3a and mitogen-activated protein kinase signaling regulate the expression of fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) during denervation-induced skeletal muscle atrophy, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 19985–19999. doi:10.1074/jbc.M114.568626.

[22] M.A. Mir, S. Majee, S. Das, D. Dasgupta, Association of chromatin with anticancer antibiotics, mithramycin and chromomycin A3, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2791–2801.

[23] C.S. Lee, A. Ungewickell, A. Bhaduri, K. Qu, D.E. Webster, R. Armstrong, W.-K. Weng, C.J. Aros, A. Mah, R.O. Chen, M. Lin, U. Sundram, H.Y. Chang, M. Kretz, Y.H. Kim, P.A. Khavari, Transcriptome sequencing in Sezary syndrome identifies Sezary cell and mycosis fungoides-associated lncRNAs and novel transcripts, *Blood.* 120 (2012) 3288–3297. doi:10.1182/blood-2012-04-423061.

[24] Q. Zhang, I. Nowak, E.C. Vonderheid, A.H. Rook, M.E. Kadin, P.C. Nowell, L.M. Shaw, M.A. Wasik, Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by

receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9148–9153.

[25] G. Barba, C. Matteucci, G. Girolomoni, L. Brandimarte, E. Varasano, M.F. Martelli, C. Mecucci, Comparative genomic hybridization identifies 17q11.2 approximately q12 duplication as an early event in cutaneous T-cell lymphomas, *Cancer Genet. Cytogenet.* 184 (2008) 48–51. doi:10.1016/j.cancergencyto.2008.03.007.

[26] B. Bellei, A. Pacchiarotti, M. Perez, T. Faraggiana, Frequent beta-catenin overexpression without exon 3 mutation in cutaneous lymphomas, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 17 (2004) 1275–1281. doi:10.1038/modpathol.3800181.

[27] E. Contassot, K. Kerl, S. Roques, R. Shane, O. Gaide, M. Dupuis, A.H. Rook, L.E. French, Resistance to FasL and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in Sezary syndrome T-cells associated with impaired death receptor and FLICE-inhibitory protein expression, *Blood.* 111 (2008) 4780–4787. doi:10.1182/blood-2007-08-109074.

[28] J. Wu, M. Nihal, J. Siddiqui, E.C. Vonderheid, G.S. Wood, Low FAS/CD95 expression by CTCL correlates with reduced sensitivity to apoptosis that can be restored by FAS upregulation, *J. Invest. Dermatol.* 129 (2009) 1165–1173. doi:10.1038/jid.2008.309.

[29] J.J. Campbell, R.A. Clark, R. Watanabe, T.S. Kupper, Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors, *Blood.* 116 (2010) 767–771. doi:10.1182/blood-2009-11-251926.

[30] E. Capriotti, E.C. Vonderheid, C.J. Thoburn, E.C. Bright, A.D. Hess, Chemokine receptor expression by leukemic T cells of cutaneous T-cell lymphoma: clinical and histopathological correlations, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2882–2892. doi:10.1038/sj.jid.5700916.

[31] M.G. Narducci, E. Scala, A. Bresin, E. Caprini, M.C. Picchio, D. Remotti, G. Ragone, F. Nasorri, M. Frontani, D. Arcelli, S. Volinia, G.A. Lombardo, G. Baliva, M. Napolitano, G. Russo, Skin homing of Sézary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV, *Blood.* 107 (2006) 1108–1115. doi:10.1182/blood-2005-04-1492.

[32] L. Kari, A. Loboda, M. Nebozhyn, A.H. Rook, E.C. Vonderheid, C. Nichols, D. Virok, C. Chang, W.-H. Horng, J. Johnston, M. Wysocka, M.K. Showe, L.C. Showe, Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 1477–1488. doi:10.1084/jem.20021726.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Effect of SAHA (a) or MTR (b) on the survival of primary SS cells. Cells from patient 1 to 4 (P1 to P4) that survived after a 48 hours treatment were identified by FACS analysis as annexin V and 7-AAD negative (viable). There were quantified as percent of total gated parental cells normalized to that in control untreated populations. Values are means of three independent biological replicates. Order 2 polynomial trend lines were

chosen for graphical representation and efficient dose 50 (ED50) were derived from the corresponding equations. ED50s are indicated for P2 who responds with an average sensitivity to both drugs

Figure 2. Effect of SAHA plus MTR treatment on the survival of primary SS cells. Drug combination effect was determined according to the design of Chou and Talalay [15]. Cascade fractions of the ED50 of each drug deduced for P2 (i.e. 4.05 μ M and 328 nM for SAHA and MTR, respectively) were applied to the 4 patients in mono or combined treatments. Cell survival was assessed, quantified and represented as for Fig. 1. Values are means of three independent biological replicates. The ED50 of each drug used in combination were extrapolated from the equations of the combined response-curves and corresponded 4/9, 2/3, 3/4 and 1/3 of the ED50 of the drugs used in mono-treatments for P1, P2, P3 and P4, respectively (see dotted arrows).

Figure 3. Hierarchical clustering of the genes differentially responsive to mono treatments. Dendrograms of patients and gene clustering feature in columns and rows, respectively. According to a log₂ pseudocolor scale, red indicates a high level of mRNA expression compared to the median value of a given gene, whereas green indicates a low level of expression. Differentially expressed genes were selected according to a filter criterion of more than a 2-fold change. **a**, Heat map visualization of SAHA significant genes including up- (Cluster 1) and down- (Cluster 2) regulated genes; based on gene expression, patients cluster in two groups, i.e. SAHA and NON-SAHA-treated. **b**, Heat map visualization of MTR significant genes including up- (Cluster 1) and down- (Cluster 2) regulated gene; based on gene expression, patients cluster in two groups, i.e. MTR- and NON-MTR-treated

Figure 4. Hierarchical clustering of the genes differentially responsive to combined treatments. Dendrograms of patients and gene clustering feature in columns and rows, respectively. Meaning of colors and selection of differentially expressed genes are detailed in Fig. 3. Heat map visualization of SAHA:MTR significant genes including up- (Cluster 1) and down- (Cluster 2) regulated genes; based on gene expression, patients cluster in two groups, i.e. SAHA+MTR- and NON- or MONO-treated

Figure 5. Venn diagram of the subsets of genes responsive to mono and combined treatments by SAHA and MTR. Lists of significant genes differentially up- and downregulated in response to mono or combined

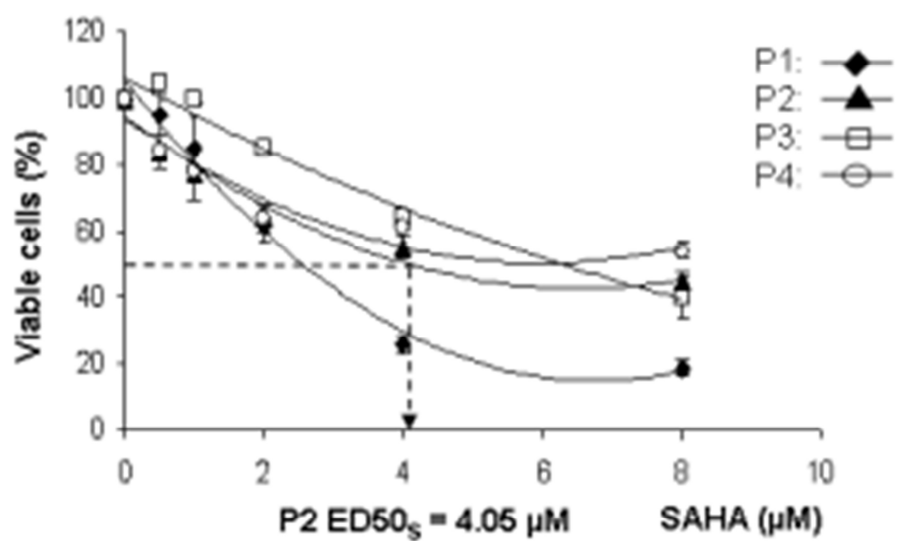
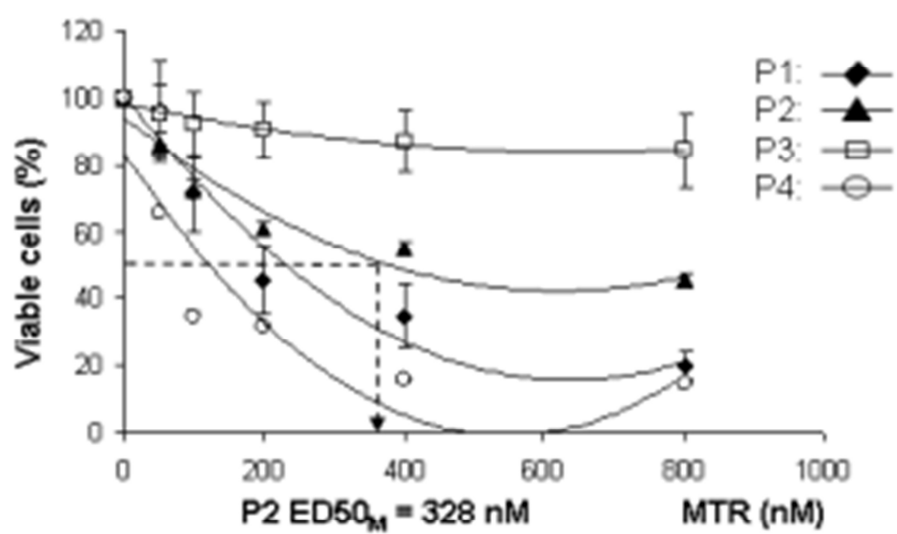
treatments were established using the Two-Way ANOVA and MLR statistical tests and their overlaps were represented graphically by a Venn diagram

Figure 6. Schematic representation of the major oncogenic signaling pathways and cellular mechanisms counteracted by SAHA and/ or MTR treatments. Black arrows indicate possible crosstalk

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Supplementary Data, Figure S1. Effect of SAHA plus MTR on the survival of primary SS cells. The ED50 of each drug used in combination was extrapolated from the equation of the combined response-curves and corresponded to 4/9, 2/3, 3/4 and 1/3 of the ED50 of the drugs used in mono-treatments for P1, P2, P3 and P4, respectively. SAHA and MTR displayed a clear synergistic behavior for cells of four patients (CI values below 1).

Supplementary Data, Figure S2. Box plot illustration of the behavior of genes responding to SAHA and/or MTR. Representative genes were selected among each of the subsets listed in supplementary table S4 and represented in Fig.5 Venn diagram. The Y-axis represents the log₂-scale probe intensities of genes and the X-axis shows the different groups according to treatments (C = control, S = SAHA, M = MTR, S:M = SAHA + MTR). Bottom, middle, and top lines of each box correspond to the 25th percentile, the 50th percentile (median), and the 75th percentile, respectively. The fences are drawn to the nearest value not exceeding 1.5 fold interquartile range, and observations beyond the fences are denoted as points and are considered outliers. The fold changes (FC) of gene expression relative to untreated controls are given at the bottom of the figures.

a**b****Figure 1**

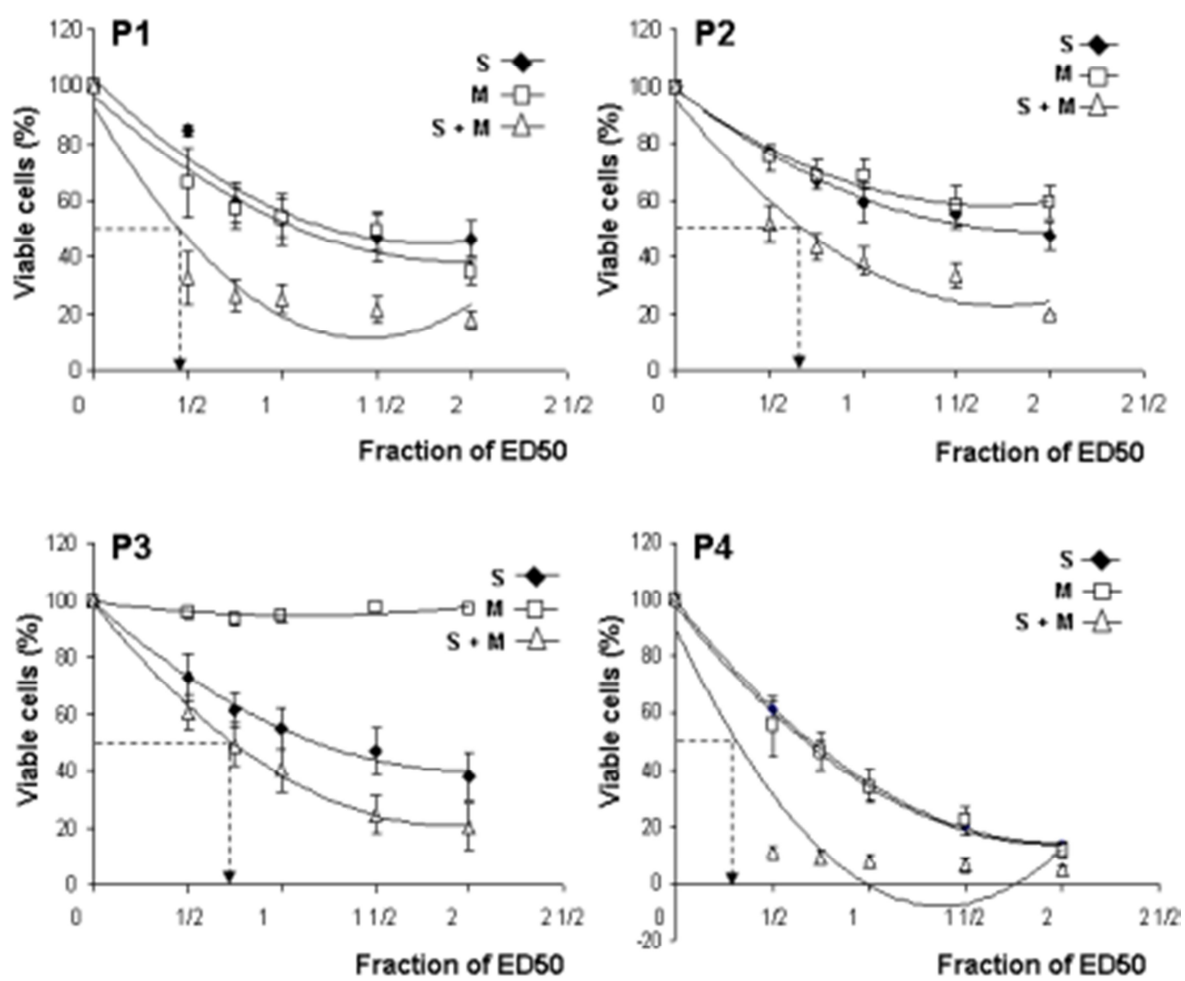
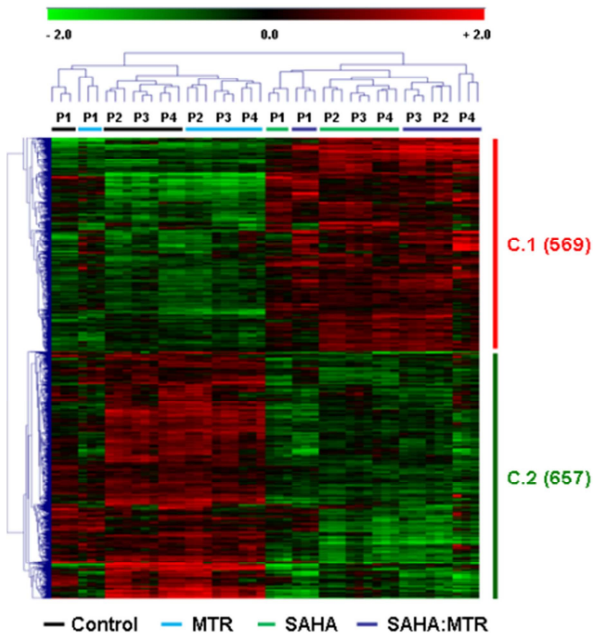


Figure 2

a



b

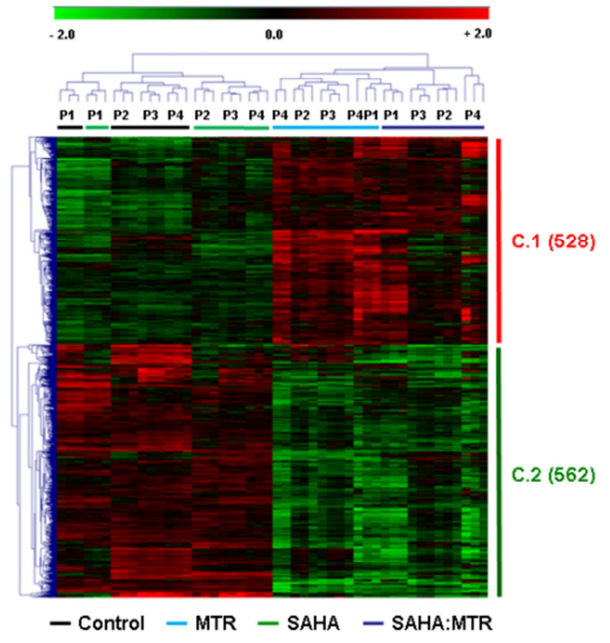


Figure 3

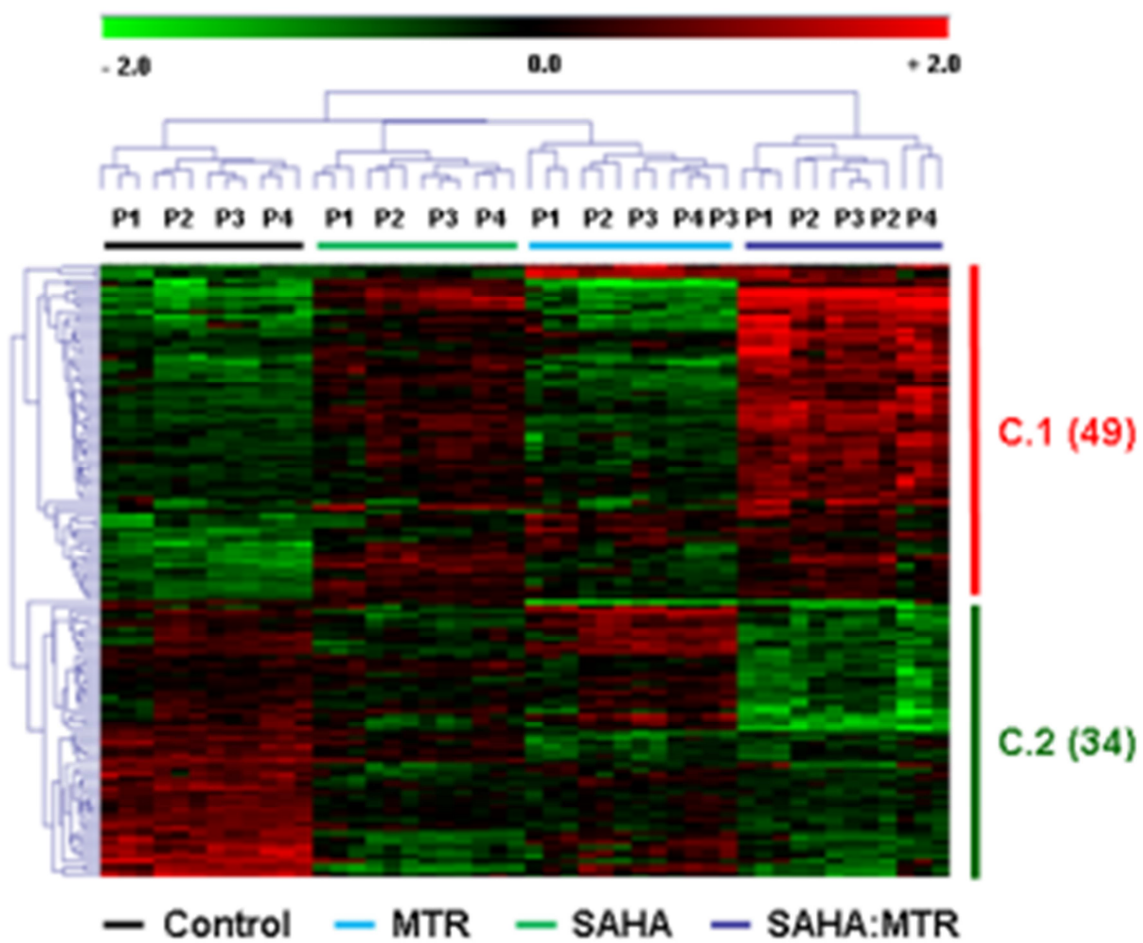
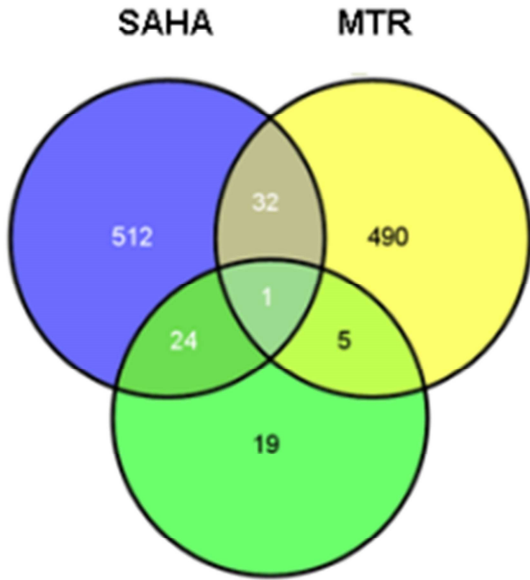


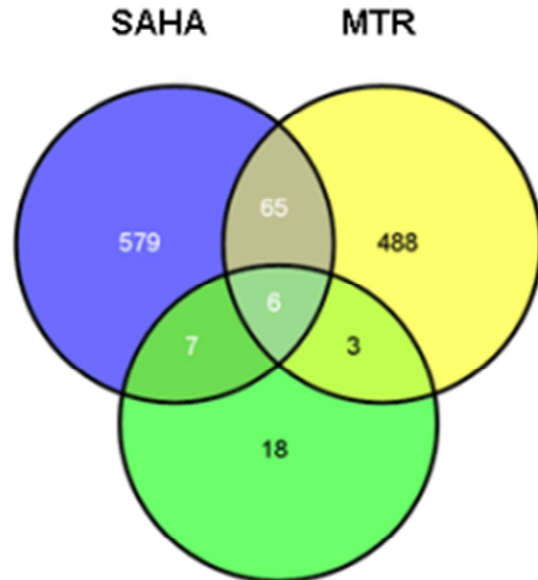
Figure 4

UP



SAHA:MTR

DOWN



SAHA:MTR

Figure 5

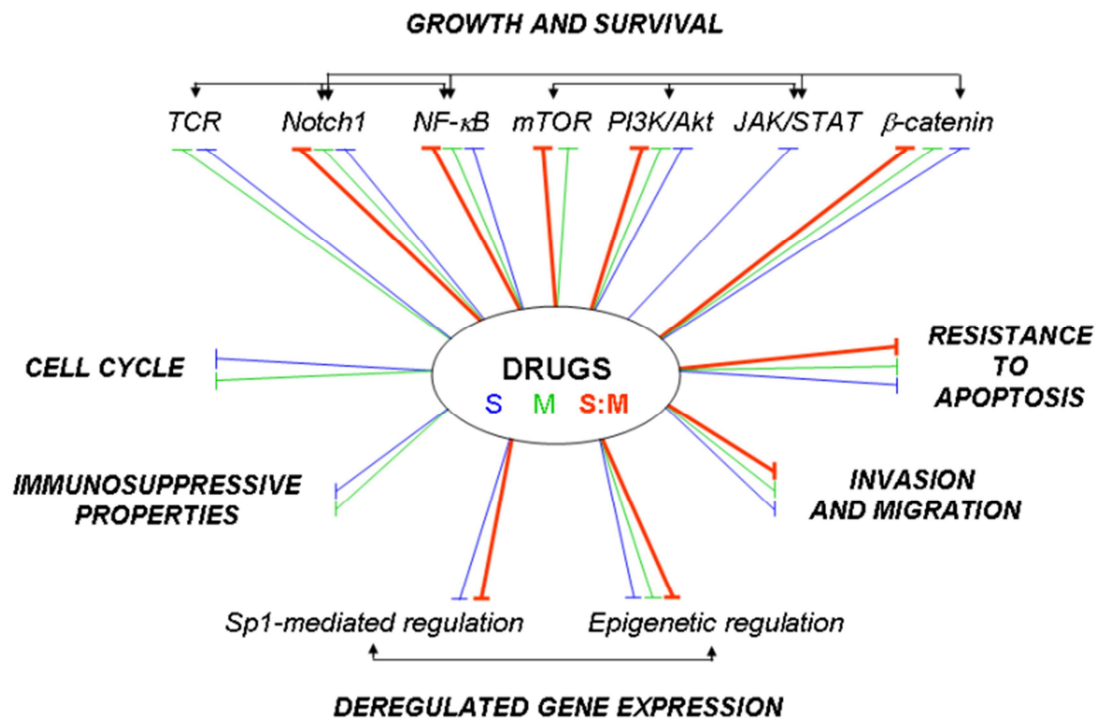


Figure 6

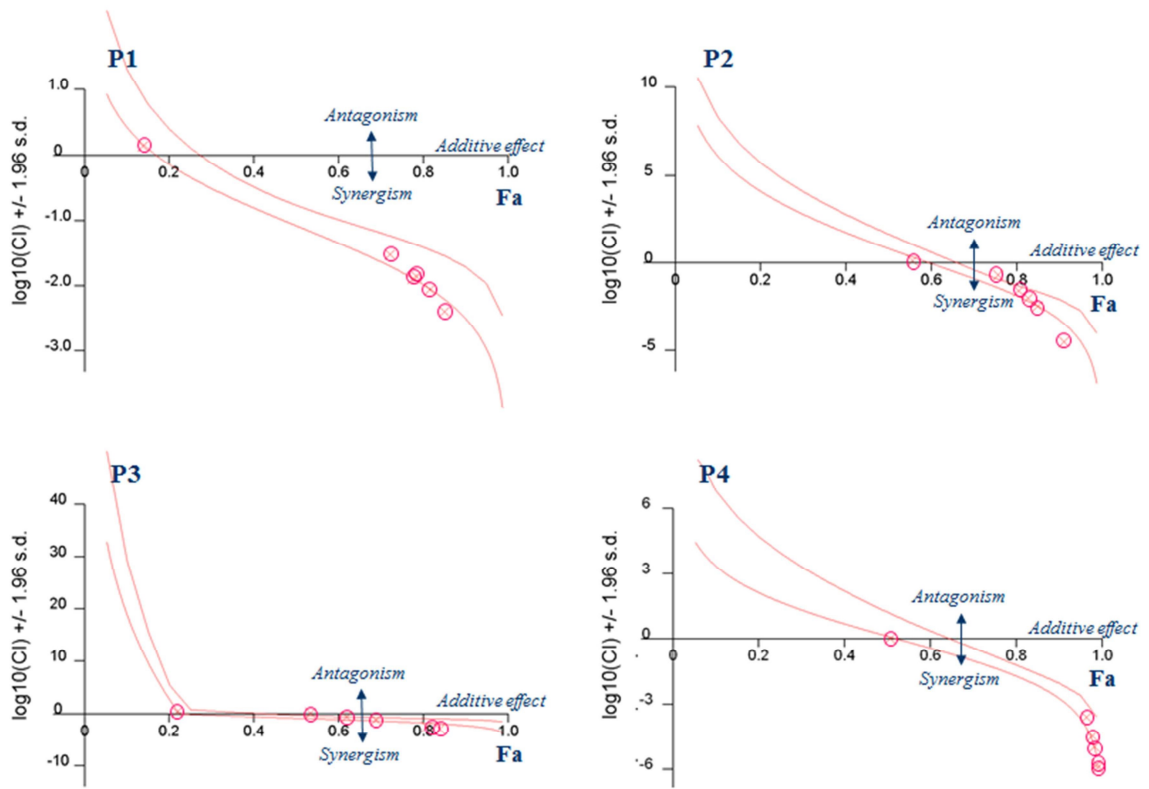
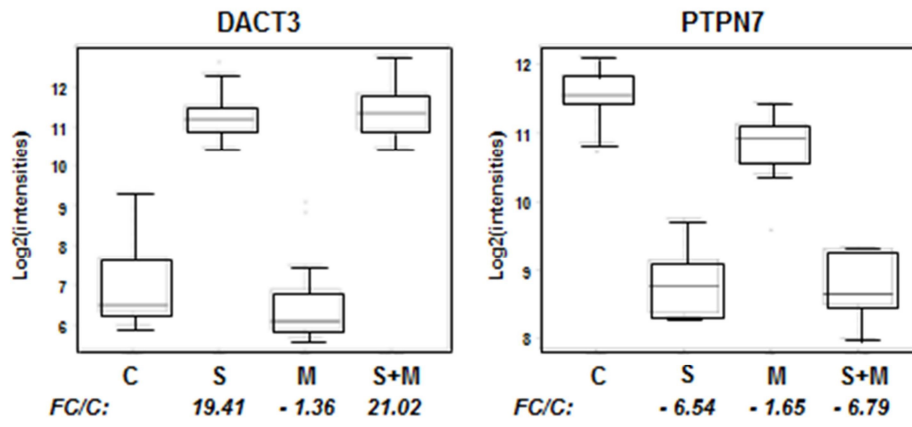


Figure S1

SAHA exclusive



MTR exclusive

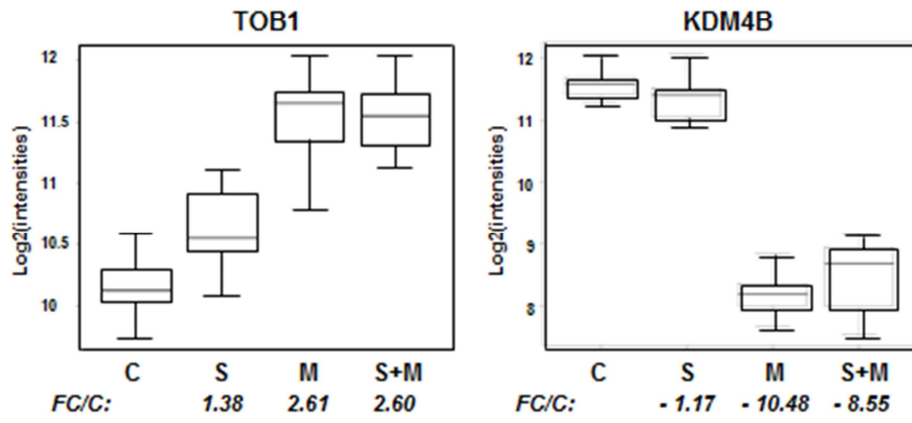


Figure S2

TABLES

Table 1. CI at combined (1:1) doses of SAHA and MTR corresponding to serial dilutions of their ED50

		Fraction ED50				
		0.5	0.75	1	1.5	2
P1	^a Fa	0.72	0.78	0.78	0.81	0.75
	^b CI values	0.030	0.013	0.000	0.009	0.004
	^c Graded symbols	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
P2	Fa	0.77	0.80	0.83	0.85	0.91
	CI values	0.078	0.009	0.002	0.001	0.000
	Graded symbols	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
P3	Fa	0.53	0.62	0.69	0.81	0.84
	CI values	1.478	0.319	0.080	0.003	0.001
	Graded symbols	---	+++	+++++	+++++	+++++
P4	Fa	0.97	0.98	0.98	0.99	0.99
	CI values	0.004	0.001	0.001	0.000	0.000
	Graded symbols	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

^a Fa is the fraction of cells affected, i.e. in this experiment, the proportion of dead cells among the total treated cells

^b CI is the Combination Index that measures the degree of drug interaction in terms of additivity (CI=1), synergism (CI<1) or antagonism (CI>1) for a given endpoint of the effect measurement

^c The graded symbols indicate: +++++ very strong synergy (<0.1); +++ synergism (0.1-0.3) and --- antagonism (1.45-3.3), according to the semi-quantitative scale of Chou [15]. Values were obtained with the help of Calcsyn software. P1 to P4: patient 1 to 4

Table 2. Most significant Gene Ontology terms and KEGG pathways found for SAHA or MTR-regulated gene

Drug response	^a GO terms and KEGG pathways	^b P value
	<i>UP</i> Nucleosome	9.04E-04
SAHA	<i>DOWN</i> GTPase regulator activity	2.05E-05
	SH2 domain	2.90E-05
	Leukocyte activation	4.20E-05
	Regulation of apoptosis	2.60E-03
	Pleckstrin homology	2.60E-03
	Regulation of cytokine production	1.40E-02
	IL-7 transduction	3.60E-02
	NOD-like receptor signaling pathway	1.60E-02
MTR	<i>DOWN</i> Phosphorylation	1.64E-34
	Acetylation	1.10E-13
	ATP-binding	3.30E-10
	Alternative splicing	1.60E-06
	SH3 domain	3.20E-06
	Cytoskeleton	3.40E-06
	GTPase regulator activity	4.20E-06
	Pleckstrin homology	9.10E-05
	Src homology-3 domain	1.10E-04
	Chromatin regulator	2.10E-04
	WD repeat	6.00E-04
	Fc gamma R-mediated phagocytosis pathway	2.30E-05
	Chemokine signaling pathway	1.50E-04
	Fc epsilon R1 signaling pathway	5.70E-04
Non-small cell lung cancer pathway	1.60E-02	

^a Obtained with DAVID Functional Annotation tool [11]

^b Corrected Benjamini Hochberg *P* value [11]

Table 3a. Most significant cancer-related genes up and downregulated by SAHA or MTR mono-treatments

Drug response	^a Gene symbol	^b P value	^c FC	^d Sensitivity	^e References	
SAHA	<i>UP</i>	<i>CAMK2N2</i>	4.60E-21	14.67	S	[1]
		<i>CDC42EP2</i>	7.27E-19	3.03	S, S:M	[2]
		<i>HSD17B8</i>	3.20E-17	4.83	S	[3]
		<i>FGFR3</i>	1.37E-16	7.86	S, S:M	[4]
		<i>DACT3</i>	1.86E-15	19.41	S	[5]
		<i>CDC37</i>	2.15E-15	2.68	S	[6]
		<i>GRHL1</i>	1.48E-14	3.13	S	[7]
		<i>DLEU1</i>	5.91E-14	4.27	S, S:M	[8]
		<i>MAPT</i>	1.86E-13	9.54	S	[9]
		<i>CDKN1C</i>	1.15E-11	13.59	S	[10]
		<i>CRIP2</i>	2.04E-09	7.25	S	[11]
		<i>JAG2</i>	2.44E-09	3.06	S	[12]
SAHA	<i>DOWN</i>	<i>FERMT3</i>	4.61E-21	- 8.45	S, S:M	[13]
		<i>PTPN7</i>	3.80E-18	- 6.12	S	[14]
		<i>CDKL1</i>	3.91E-18	- 3.40	S	[15]
		<i>RGL4</i>	1.02E-17	- 30.83	S	[16]
		<i>DOK2</i>	2.54E-15	- 7.60	S	[17]
		<i>PSMB10</i>	2.56E-15	- 6.31	S	[18]
		<i>IL27RA</i>	3.77E-15	- 7.73	S	[19]
		<i>FUT7</i>	4.67E-15	- 5.17	S, M, S:M	[20]
		<i>MGAT3</i>	8.91E-15	- 2.83	S, M, S:M	[21]
		<i>PTPRCAP</i>	1.11E-14	- 8.82	S	[22]
		<i>FMNL1</i>	5.23E-14	- 4.74	S	[23]
		<i>ICAM3</i>	3.76E-13	- 4.43	S	[24]
MTR	<i>UP</i>	<i>BRD8</i>	2.19E-16	2.95	M	[25]
		<i>TOB1</i>	8.78E-14	2.61	M	[26]
		<i>SNHG1</i>	1.29E-13	3.10	M	[27]
		<i>BIRC2</i>	3.66E-11	2.30	M	[28]
		<i>ISCU</i>	1.22E-08	2.61	M, S:M	[29]
		<i>C22orf29</i>	3.41E-08	2.96	M	[30]
	<i>DOWN</i>	<i>KDM4B</i>	2.92E-26	- 10.48	M	[31]
		<i>CHST11</i>	2.62E-22	- 5.49	M	[32]
		<i>PREX1</i>	1.14E-20	- 6.77	M	[33]
		<i>NCOR2</i>	9.17E-20	- 13.71	M	[34]
		<i>CPPED1</i>	1.02E-19	- 3.59	M, S:M	[35]
		<i>ATP11A</i>	7.00E-19	- 4.05	M	[36]
	<i>MAD1L1</i>	4.07E-18	- 6.85	S, M	[37]	
	<i>TBC1D6</i>	1.78E-17	- 3.26	M	[38]	
	<i>DNM2</i>	1.24E-16	- 4.35	M	[39]	
	<i>CAMK1D</i>	2.92E-16	- 5.79	M	[40]	
	<i>BRE</i>	3.98E-15	- 3.06	M	[41]	
	<i>CMIP</i>	7.72E-15	- 5.09	M	[42]	

^a Only the twelve most significant cancer-related genes are listed for SAHA up- or down- and MTR downregulated genes

^b Nominal P value

^c Fold changes (FC) are expressed relative to untreated cell

samples

^d S; M; S, M; and S:M refer to differential responses to SAHA, MTR, SAHA and MTR and SAHA:MTR interaction

^e References are listed in Supplementary Data, Table S8

Table 3b. Most significant cancer-related genes up- or downregulated by SAHA:MTR interaction

Drug response	Gene symbol	^a P value	^b FC	^c Sensitivity	^d Behavior	^e References
UP	<i>FGF22</i>	7.42E-07	4.36	S:M	Synergy	[1]
	<i>EIF4EBP1</i>	4.16E-05	2.18	S:M		[2]
	<i>SLC22A17</i>	1.34E-04	4.11	S:M		[3]
	<i>NPTX1</i>	6.44E-04	4.71	S:M		[4]
	<i>BIK</i>	9.47E-04	2.03	S:M		[5]
	<i>BAMBI</i>	1.83E-05	9.53	S, S:M	Potentiation	[6]
	<i>FGFR3</i>	1.15E-04	27.99	S, S:M		[7]
	<i>DLK2</i>	1.91E-04	5.96	S, S:M		[8]
	<i>NGFR</i>	2.23E-04	7.33	S, S:M		[9]
	<i>MAP1A</i>	5.64E-04	3.73	S, S:M		[10]
	<i>TNFRSF12A</i>	7.62E-04	6.72	S, S:M		[11]
	<i>CDC42EP2</i>	7.66E-04	4.33	S, S:M		[12]
	<i>DLEU1</i>	1.66E-04	2.89	S, S:M	Antagonism	[13]
	<i>SH2B2</i>	2.66E-04	2.33	S, M, S:M		[14]
	<i>NIT1</i>	2.97E-04	2.02	S, S:M		[15]
	<i>ISCU</i>	4.85E-04	2.13	M, S:M		[16]
DOWN	<i>FBLN5</i>	4.78E-08	- 2.20	S:M	Synergy	[17]
	<i>PPP1R10</i>	5.72E-07	- 2.30	S:M		[18]
	<i>TAP1</i>	2.28E-05	- 3.89	S:M		[19]
	<i>ADAR</i>	1.70E-04	- 2.01	S:M		[20]
	<i>TADA3</i>	3.33E-04	- 2.06	S:M		[21]
	<i>PBX2</i>	1.15E-03	- 2.75	S:M		[22]
	<i>PSMB8</i>	1.23E-03	- 5.08	S:M		[23]
	<i>B3GALT4</i>	1.88E-04	- 3.65	S, S:M		Potentiation
	<i>AGMAT</i>	2.16E-05	- 3.02	S, S:M	Antagonism	[25]
	<i>FERMT3</i>	3.28E-05	- 6.53	S, S:M		[26]
	<i>PTPN9</i>	2.18E-04	- 3.02	M, S:M		[27]
	<i>MGAT3</i>	8.34E-08	- 3.44	S, M, S:M		[28]
	<i>CORO1A</i>	8.13E-06	- 5.22	S, M, S:M		[29]
	<i>FUT7</i>	9.36E-05	- 4.87	S, M, S:M		[30]

^{a, b, c} As for Table 3a

^d Synergy refers to the behavior of genes which only responded to SAHA:MTR interaction; Potentiation refers to the behavior of genes whose response to SAHA was amplified by SAHA:MTR interaction; Antagonism refers to the behavior of genes whose response to SAHA and/or MTR was reduced by SAHA:MTR interaction (refer to Table S5 for details).

^e References are listed in Supplementary Data, Table S9

Table 4. Real-Time Quantitative PCR* of selected genes

Genes	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Drugs
<i>CAMK2M2</i>	5.833 ± 0.341	54.300 ± 8.132	32.767 ± 1.527	SAHA
<i>DACT3</i>	4.333 ± 0.425	140.000 ± 22.910	31.167 ± 3.694	
<i>FERMT3</i>	0.122 ± 0.021	0.073 ± 0.002	0.080 ± 0.010	
<i>KDM4</i>	0.009 ± 0.001	0.029 ± 0.008	0.147 ± 0.003	MTR
<i>PREX1</i>	0.092 ± 0.007	0.196 ± 0.047	0.148 ± 0.027	
<i>NCOR2</i>	0.128 ± 0.004	0.091 ± 0.012	0.088 ± 0.014	
<i>GRK5</i>	0.055 ± 0.004	0.066 ± 0.015	0.022 ± 0.004	
<i>BAMBI</i>	26.633 ± 7.893	62.650 ± 13.400	30.633 ± 5.624	SAHA:MTR
<i>DLK2</i>	1.767 ± 0.357	8.850 ± 0.884	3.400 ± 0.984	
<i>NGFR</i>	28.067 ± 5.960	228.900 ± 54.942	66.567 ± 11.745	
<i>SLC4A11</i>	16.367 ± 0.708	45.750 ± 0.318	29.033 ± 3.462	
<i>CORO1A</i>	0.124 ± 0.011	0.110 ± 0.002	0.048 ± 0.008	

*The relative quantification in gene expression was performed as detailed in Methods; values are means of biological triplicates +/- Standard Error of the Mean and correspond to fold change in gene expression relative to untreated condition.

SUPPLEMENTARY TABLES LEGENDS

Supplementary Data, Table S1. Phenotypic data of the SS patients included in the study.

Supplementary Data, Table S2. Fa and DRI values at combined (1.1) dose of SAHA and MTR corresponding to serial dilutions of their ED50.

Supplementary Data, Table S3. Drug-responsive genes selected by two way ANOVA and MLR statistical tests.

Supplementary Data, Table S4. Subsets of SAHA and/or MTR responsive genes corresponding to the Venn diagram of figure 5.

Supplementary Data, Table S5. Behavior of the genes differentially responding to SAHA:MTR interaction.

Supplementary Data, Table S6. Cross check of SAHA upregulated genes enriched for Sp1 binding sites with SAHA:MTR upregulated genes.

Supplementary Data, Table S7. Most significant GO terms and KEGG pathways enriched within the genes modulated by SAHA or MTR.

Supplementary Data, Table S8. References table 3a

Supplementary Data, Table S9. References table 3b

Références

- Adams, M. D., & Sekelsky, J. J. (2002). From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet.*, 3(3):189-98.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., & Venter, C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287: 2185-95.
- Adamson, A. L., Wright, N., & LaJeunesse, D. R. (2005). Modeling early Epstein-Barr virus infection in *Drosophila melanogaster*: the BZLF1 protein. *Genetics.*, 171(3):1125-35.
- Agaisse, H. (2008). Investigating the involvement of host factors involved in intracellular pathogen infection by RNAi in *Drosophila* cells. *Methods Mol Biol.*, 415:395-402.
- Agaisse, H., & Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev.*, 198:72-82.
- Agaisse, H., Burrack, L. S., Philips, J. A., Rubin, E. J., Perrimon, N., & Higgins, D. E. (2005). Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science.*, 309(5738):1248-51.
- Aggarwal, K., Rus, F., Vriesema-Magnuson, C., Ertürk-Hasdemir, D., Paquette, N., & Silverman, N. (2008). Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS Pathog.*, 4(8):e1000120.
- Akagi, K., Sarhan, M., Sultan, A. R., Nishida, H., Koie, A., Nakayama, T., et al. (2016). A biological timer in the fat body comprising Blimp-1, β Ftz-f1 and Shade regulates pupation timing in *Drosophila melanogaster*. *Development.*, 143(13):2410-6.
- Akimana, C., Al-Khodori, S., & Abu Kwaik, Y. (2010). Host factors required for modulation of phagosome biogenesis and proliferation of *Francisella tularensis* within the cytosol. *PLoS One.*, 5(6):e11025.
- Alarco, A. M., Marcil, A., Chen, J., Suter, B., Thomas, D., & Whiteway, M. (2004). Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. *J Immunol.*, 172(9):5622-8.
- Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W., et al. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc.*, 8(9):1765-86.
- Andersen, D. S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., et al. (2015). The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature.*, 522(7557):482-6.
- Andersen, D. S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., et al. (2015). The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature.*, 522(7557):482-6.

- Angus DC and van der Poll T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.*, 369(21):2063.
- Apidianakis , Y., & Rahme , L. G. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat Protoc.*, 4(9):1285-94.
- Apidianakis , Y., Mindrinis, M. N., Xiao, W., Lau, G. W., Baldini, R. L., Davis, R. W., et al. (2005). Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(7):2573-8.
- Apidianakis , Y., Rahme, L. G., Heitman , J., Ausubel , F. M., Calderwood , S. B., & Mylonakis , E. (2004). Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell.*, 3(2):413-9.
- Apidianakis , Y., Rahme, L. G., Heitman, J., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B., & Mylonakis, E. (2004). Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell.*, 3(2):413-9.
- Apidianakis, Y., Mindrinis, M. N., Xiao, W., Tegos, G. P., Papisov, M. I., Hamblin, M. R., et al. (2007). Involvement of skeletal muscle gene regulatory network in susceptibility to wound infection following trauma. *PLoS One.*, 2(12):e1356.
- Arefin, B., Kucerova, L., Dobes, P., Markus, R., Strnad, H., Wang, Z., et al. (2014). Genome-wide transcriptional analysis of *Drosophila* larvae infected by entomopathogenic nematodes shows involvement of complement, recognition and extracellular matrix proteins. *J Innate Immun.*, 6(2):192-204.
- Ashburner , M. (1993). FlyBase. *GNome News*, 13:19-20.
- Aulchenko, Y. S., Ripke, S., Isaacs, A., & Van Duijn, C. M. (2007). GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics.*, 23(10):1294-6.
- Babcock, D. T., Brock, A. R., Fish, G. S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M. A., et al. (2008). Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(29):10017-22.
- Baeg, G. H., Zhou, R., & Perrimon, N. (2005). Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 19(16):1861-70.
- Baeuerle PA. (1991). The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta.*, 1072(1):63-80.
- Baker, S. P., O'Neill, B., Haddon, W. J., & Long, W. B. (1974). The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma.*, 14(3):187-96.
- Balding, D. J. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.*, 7(10):781-91.
- Bangi, E. (2013). *Drosophila* at the intersection of infection, inflammation, and cancer. *Front Cell Infect Microbiol.*, 3:103.

- Baril, C., & Therrien, M. (2006). Alphabet, a Ser/Thr phosphatase of the protein phosphatase 2C family, negatively regulates RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *Dev Biol.*, 294(1):232-45.
- Baril, C., Sahmi, M., Ashton-Beaucage, D., Stronach, B., & Therrien, M. (2009). The PP2C Alphabet is a negative regulator of stress-activated protein kinase signaling in *Drosophila*. *Genetics.*, 181(2):567-79.
- Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.*, 118(2):413-20.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., et al. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics.*, 167(2):761-81.
- Belvin, M. P., & Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12:393-416.
- Berkey, C. D., Blow, N., & Watnick, P. I. (2009). Genetic analysis of *Drosophila melanogaster* susceptibility to intestinal *Vibrio cholerae* infection. *Cell Microbiol.*, 11(3):461-74.
- Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., et al. (2001). Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.*, 344(10):699-709.
- Bernards, A., & Hariharan, I. K. (2001). Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev.*, 11(3):274-8.
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., & Darnell, J. J. (2001). A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(17):9563-8.
- Bianchi, K., & Meier, P. (2009). A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol Cell.*, 36(5):736-42.
- Bidla, G., Dushay, M. S., & Theopold, U. (2007). Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci.*, 120(Pt 7):1209-15.
- Bidla, G., Hauling, T., Dushay, M. S., & Theopold, U. (2009). Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun.*, 1(4):301-8.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2004). Function of the *drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.*, 5(11):1175-80.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2004). Function of the *drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.*, 5(11):1175-80.
- Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I. G., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2006). Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.*, 2(2):e14.

- Biteau, B., Karpac, J., Hwangbo, D., & Jasper, H. (2011). Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp Gerontol.*, 46(5):349-54.
- Boman, H. G., Nilsson, I., & Rasmuson, B. (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature.*, 237(5352):232-5.
- Bond, D., & Foley, E. (2009). A quantitative RNAi screen for JNK modifiers identifies Pvr as a novel regulator of *Drosophila* immune signaling. *PLoS Pathog.*, 5(11):e1000655.
- Bone RC. (1996). Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med*, 24: 1125–8.
- Bone, R. C. (1996b). Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med.*, 125(8):680-7.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., et al. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.*, 101(6):1644-55.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E., & Baguñà, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol.*, 280(1):73-86.
- Bou Sleiman, M. S., Osman, D., Massouras, A., Hoffmann, A. A., Lemaitre, B., & Deplancke, B. (2015). Genetic, molecular and physiological basis of variation in *Drosophila* gut immunocompetence. *Nat Commun.*, 6:7829.
- Boutros, M., Agaisse, H., & Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell.*, 3(5):711-22.
- Brandt, S. M., Dionne, M. S., Khush, R. S., Pham, L. N., Vigdal, T. J., & Schneider, D. S. (2004). Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in a *Salmonella*-Infected Fruit Fly. *PLoS Biol.*, 2(12):e418.
- Brandt, S. M., Jaramillo-Gutierrez, G., Kumar, S., Barillas-Mury, C., & Schneider, D. S. (2008). Use of a *Drosophila* model to identify genes regulating *Plasmodium* growth in the mosquito. *Genetics.*, 180(3):1671-8.
- Broderick, K. E., Feala, J., McCulloch, A., Paternostro, G., Sharma, V. S., Pilz, R. B., et al. (2006). The nitric oxide scavenger cobinamide profoundly improves survival in a *Drosophila melanogaster* model of bacterial sepsis. *FASEB J.*, 20(11):1865-73.
- Brown, S., Hu, N., & Hombría, J. C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol.*, 11(21):1700-5.
- Brun-Buisson, Meshaka, Pinton, & Vallet. (2004). EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.*, 30(4):580-8.

- Buchon, N., Poidevin, M., Kwon, H. M., Guillou, A., Sottas, V., Lee, B. L., et al. (2009). A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(30):12442-7.
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol.*, 14(12):796-810.
- Campos, I., Geiger, J. A., Santos, A. C., Carlos, V., & Jacinto, A. (2010). Genetic screen in *Drosophila melanogaster* uncovers a novel set of genes required for embryonic epithelial repair. *Genetics.*, 184(1):129-40.
- Cao, Y., Chtarbanova, S., Petersen, A. J., & Ganetzky, B. (2013). Dnr1 mutations cause neurodegeneration in *Drosophila* by activating the innate immune response in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(19):E1752-60.
- Cardon, L. R., & Palmer, L. J. (2003). Population stratification and spurious allelic association. *Lancet.*, 361(9357):598-604.
- Celniker, S. E., Wheeler, D. A., Kronmiller, B., Carlson, J. W., Halpern, A., Patel, S., et al. (2002). Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biol.*, 3(12):RESEARCH0079.
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, 29(6):263-71.
- Chambers, M. C., Jacobson, E., Khalil, S., & Lazzaro, B. P. (2014). Thorax injury lowers resistance to infection in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun.*, 82(10):4380-9.
- Chamilos, G., Lionakis, M. S., Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. (2007). Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis.*, 7(1):42-55.
- Chang, C. I., Ihara, K., Chelliah, Y., Mengin-Lecreux, D., Wakatsuki, S., & Deisenhofer, J. (2005). Structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(29):10279-84.
- Charroux, B., Rival, T., Narbonne-Reveau, K., & Royet, J. (2009). Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect.*, 11(6-7):631-6.
- Charroux, B., & Royet, J. (2009). Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(24):9797-802.
- Chatterjee, A., Roy, D., Patnaik, E., & Nongthomba, U. (2016). Muscles provide protection during microbial infection by activating innate immune response pathways in *Drosophila* and zebrafish. *Dis Model Mech.*, 9(6):697-705.
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.*, 10(12):826-37.

- Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S., & Hou, S. X. (2002). mom identifies a receptor for the Drosophila JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev.*, 16(3):388-98.
- Chen, J., Xie, C., Tian, L., Hong, L., Wu, X., & Han, J. (2010). Participation of the p38 pathway in Drosophila host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107(48):20774-9.
- Chen, W., White, M. A., & Cobb, M. H. (2002). Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem.*, 277(51):49105-10.
- Cheng, L. W., & Portnoy, D. A. (2003). Drosophila S2 cells: an alternative infection model for Listeria monocytogenes. *Cell Microbiol.*, 5(12):875-85.
- Cheng, L. W., & Portnoy, D. A. (2003). Drosophila S2 cells: an alternative infection model for Listeria monocytogenes. *Cell Microbiol.*, 5(12):875-85.
- Choe, K. M., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., & Anderson, K. V. (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in Drosophila. *Science.*, 296(5566):359-62.
- Chotkowski, H. L., Ciota, A. T., Jia, Y., Puig-Basagoiti, F., Kramer, L. D., Shi, P. Y., et al. (2008). West Nile virus infection of Drosophila melanogaster induces a protective RNAi response. *Virology.*, 377(1):197-206.
- Clark, J. M., Weeks, W. R., & Tatton, J. (1982). Drosophila myiasis mimicking sepsis in a newborn. *West J Med.*, 136(5):443-4.
- Clark, R. I., Woodcock, K. J., Geissmann, F., Trouillet, C., & Dionne, M. S. (2011). Multiple TGF- β superfamily signals modulate the adult Drosophila immune response. *Curr Biol.*, 21(19):1672-7.
- Cloud-Hansen, K. A., Peterson, S. B., Stabb, E. V., Goldman, W. E., McFall-Ngai, M. J., & Handelsman, J. (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat Rev Microbiol.*, 4(9):710-6.
- Cordero, J. B., Macagno, J. P., Stefanatos, R. K., Strathdee, K. E., Cagan, R. L., & Vidal, M. (2010). Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev Cell.*, 18(6):999-1011.
- Cronin, S. J., Nehme, N. T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J. A., Schramek, D., et al. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science.*, 325(5938):340-3.
- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M., & Lemaitre, B. (2001). Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(22):12590-5.

- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Tzou, P., Rubin, G. M., & Lemaitre, B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.*, 21(11):2568-79.
- de Lima Pimenta, A., Di Martino, P., Le Bouder, E., Hulen, C., & Blight, M. A. (2003). In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect.*, 5(13):1177-87.
- Defaye, A., Evans, I., Crozatier, M., Wood, W., Lemaitre, B., & Leulier, F. (2009). Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *J Innate Immun.*, 1(4):322-34.
- Dekanty, A., Barrio, L., Muzzopappa, M., Auer, H., & Milán, M. (2012). Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in *Drosophila* epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109(50):20549-54.
- Delaney, J. R., Stöven, S., Uvell, H., Anderson, K. V., Engström, Y., & Mlodzik, M. (2006). Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *EMBO J.*, 25(13):3068-77.
- Dimarcq, J. L., Imler, J. L., Lanot, R., Ezekowitz, R. A., Hoffmann, J. A., Janeway, C. A., et al. (1997). Treatment of l(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem Mol Biol.*, 27(10):877-86.
- Dionne, M. S., & Schneider, D. S. (2008). Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech.*, 1(1):43-9.
- Dionne, M. S., Ghori, N., & Schneider, D. S. (2003). *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun.*, 71(6):3540-50.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., et al. (2015). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J.*, doi: 10.1111/iwj.12557.
- Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G., & Chen, Z. J. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell.*, 22(2):245-57.
- Ekgren, S., & Hultmark, D. (2001). A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 284(4):998-1003.
- El Chamy, L., Leclerc, V., Caldelari, I., & Reichhart, J. M. (2008). Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. *Nat Immunol.*, 9(10):1165-70.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.*, 391(6662):43-50.

- Ertürk-Hasdemir, D., Broemer, M., Leulier, F., Lane, W. S., Paquette, N., Hwang, D., et al. (2009). Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(24):9779-84.
- Fan, J., Kapus, A., Li, Y. H., Rizoli, S., Marshall, J. C., & Rotstein, O. D. (2000). Priming for enhanced alveolar fibrin deposition after hemorrhagic shock: role of tumor necrosis factor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 22: 412–21.
- Fan, J., Li, Y., Levy, R. M., Fan, J. J., Hackam, D. J., Vodovotz, Y., et al. (2007). Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J. Immunol.*, 178: 6573–80.
- Fauvarque, M. O., Bergeret, E., Chabert, J., Dacheux, D., Satre, M., & Attree, I. (2002). Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb Pathog.*, 32(6):287-95.
- Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., et al. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.*, 17(5):1217-27.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol.*, 7(11):862-74.
- Fessler, L. I., Nelson, R. E., & Fessler, J. H. (1994). *Drosophila* extracellular matrix. *Methods Enzymol.*, 245:271-94.
- Filipe, S. R., Tomasz, A., & Ligoxygakis, P. (2005). Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the *Drosophila* Toll pathway. *EMBO Rep.*, 6(4):327-33.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature.*, 332(6167):853-6.
- Foley, E., & O'Farrell, P. H. (2004). Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen. *PLoS Biol.*, 2(8):E203.
- Fox, R. M., Hanlon, C. D., & Andrew, D. J. (2010). The CrebA/Creb3-like transcription factors are major and direct regulators of secretory capacity. *J Cell Biol.*, 191(3):479-92.
- Funk, D. J., Parrillo, J. E., & Kumar, A. (2009). Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin.*, 25(1):83-101.
- Ganguly, A., Jiang, J., & Ip, Y. T. (2005). *Drosophila* WntD is a target and an inhibitor of the Dorsal/Twist/Snail network in the gastrulating embryo. *Development.*, 132(15):3419-29.
- Geroulanos S and Douka ET. (2006). Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.*, 32(12):2077.
- Gilliet, M., & Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol.*, 20(4):401-7.

- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., et al. (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science.*, 302(5653):2126-30.
- Golic, M. M., Rong, Y. S., Petersen, R. B., Lindquist, S. L., & Golic, K. G. (1997). FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 25(18):3665-71.
- Golic, M. M., Rong, Y. S., Petersen, R. B., Lindquist, S. L., & Golic, K. G. (1997). FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 25(18):3665-71.
- Gordon, M. D., Dionne, M. S., Schneider, D. S., & Nusse, R. (2005). WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in *Drosophila* development and immunity. *Nature.*, 437(7059):746-9.
- Gordon, M. D., S, J., Schneider, D. S., & Nusse, R. (2008). Pathogenesis of listeria-infected *Drosophila* wntD mutants is associated with elevated levels of the novel immunity gene edin. *PLoS Pathog.*, 4(7):e1000111.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A. A., Reichhart, J. M., Wang, C., Butt, T. M., et al. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell.*, 127(7):1425-37.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., et al. (2002). The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature.*, 416(6881):640-4.
- Grönholm, J., Kaustio, M., Myllymäki, H., Kallio, J., Saarikettu, J., Kronhamn, J., et al. (2012). Not4 enhances JAK/STAT pathway-dependent gene expression in *Drosophila* and in human cells. *FASEB J.*, 26(3):1239-50.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R., & Calos, M. P. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics.*, 166(4):1775-82.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R., & Calos, M. P. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics.*, 166(4):1775-82.
- Guichard, A., Park, J. M., Cruz-Moreno, B., Karin, M., & Bier, E. (2006). Anthrax lethal factor and edema factor act on conserved targets in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(9):3244-9.
- Gullberg, D., Fessler, L. I., & Fessler, J. H. (1994). Differentiation, extracellular matrix synthesis, and integrin assembly by *Drosophila* embryo cells cultured on vitronectin and laminin substrates. *Dev Dyn.*, 199(2):116-28.
- Guntermann, S., Primrose, D. A., & Foley, E. (2009). Dnr1-dependent regulation of the *Drosophila* immune deficiency signaling pathway. *Dev Comp Immunol.*, 33(1):127-34.

- Han, Z. S., Enslen, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I. H., Barrett, T., et al. (1998). A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol.*, 18(6):3527-39.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C. A., Newton, M. A., et al. (2008). *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature.*, 454(7206):890-3.
- Hao, Y., Frey, E., Yoon, C., Wong, H., Nestorovski, D., Holzman, L. B., et al. (2016). An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK. *Elife.*, 5. pii: e14048.
- Harris, H. E., & Raucchi, A. (2006). Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep. Harris HE, Raucchi A., 7:774–8.*
- Haselton, A. T., & Fridell, Y. W. (2011). Insulin injection and hemolymph extraction to measure insulin sensitivity in adult *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp.*, (52). pii: 2722.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M. S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., et al. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell.*, 4(5):827-37.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.*, 284(5418):1313-8.
- Hoover, L., Bochicchio, G. V., Napolitano, L. M., Joshi, M., Bochicchio, K., Meyer, W., et al. (2006). Systemic inflammatory response syndrome and nosocomial infection in trauma. *J. Trauma*, 61: 310–6.
- Horng, T., & Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(22):12654-8.
- Hoskins, R. A., Carlson, J. W., Kennedy, C., Acevedo, D., Evans-Holm, M., Frise, E., et al. (2007). Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science.*, 316(5831):1625-8.
- Hotchkiss, R. S., & Karl, I. E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.*, 348(2):138-50.
- Hu, S., & Yang, X. (2000). dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J Biol Chem.*, 6;275(40):30761-4.
- Hyrsl, P., Dobes, P., Wang, Z., Hauling, T., Wilhelmsson, C., & Theopold, U. (2011). Clotting factors and eicosanoids protect against nematode infections. *J Innate Immun.*, 3(1):65-70.
- Igaki, T., & Miura, M. (2014). The *Drosophila* TNF ortholog Eiger: emerging physiological roles and evolution of the TNF system. *Semin Immunol.*, 26(3):267-74.
- Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Aigaki, T., & Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.*, 21(12):3009-18.

- Igboin, C. O., Tordoff, K. P., Moeschberger, M. L., Griffen, A. L., & Leys, E. J. (2011). Porphyromonas gingivalis-host interactions in a Drosophila melanogaster model. *Infect Immun.*, 79(1):449-58.
- Imrichová, H., Hulselmans, G., Atak, Z. K., Potier, D., & Aerts, S. (2015). i-cisTarget 2015 update: generalized cis-regulatory enrichment analysis in human, mouse and fly. *Nucleic Acids Res.*, 43(W1):W57-64.
- International HapMap Consortium. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature.*, 437(7063):1299-320.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., et al. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(26):15119-24.
- Iwai, K., & Tokunaga, F. (2009). Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.*, 10(7):706-13.
- Jang, I. H., Chosa, N., Kim, S. H., Nam, H. J., Lemaitre, B., Ochiai, M., et al. (2006). A Spätzle-processing enzyme required for toll signaling activation in Drosophila innate immunity. *Dev Cell.*, 10(1):45-55.
- Jasper, H., Benes, V., Schwager, C., Sauer, S., Clauder-Münster, S., Ansorge, W., et al. (2001). The genomic response of the Drosophila embryo to JNK signaling. *Dev Cell.*, 1(4):579-86.
- Kallio, J., Myllymäki, H., Grönholm, J., Armstrong, M., Vanha-aho, L. M., Mäkinen, L., et al. (2010). Eye transformer is a negative regulator of Drosophila JAK/STAT signaling. *FASEB J.*, 24(11):4467-79.
- Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R. A., & Rämet, M. (2005). Functional analysis of immune response genes in Drosophila identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect.*, 7(5-6):811-9.
- Kambris, Z., Brun, S., Jang, I. H., Nam, H. J., Romeo, Y., Takahashi, K., et al. (2006). Drosophila immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr Biol.*, 16(8):808-13.
- Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., Hong, M., Shaito, A., et al. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell.*, 15(4):535-48.
- Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., & Miura, M. (2002). Wengen, a member of the Drosophila tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *J Biol Chem.*, 277(32):28372-5.
- Kanda, H., Igaki, T., Okano, H., & Miura, M. (2011). Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(47):18977-82.
- Kaneko, T., Goldman, W. E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., et al. (2004). Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the Drosophila IMD pathway. *Immunity.*, 20(5):637-49.

- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J. H., Ueda, K., Oshima, Y., et al. (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol.*, 7(7):715-23.
- Katzenberger, R. J., Loewen, C. A., Bockstruck, R. T., Woods, M. A., Ganetzky, B., & Wassarman, D. A. (2015). A Method to Inflict Closed Head Traumatic Brain Injury in Drosophila. *J Vis Exp.*, (100):e52905.
- Kauppila, S., Maaty, W. S., Chen, P., Tomar, R. S., Eby, M. T., Chapo, J., et al. (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in Drosophila. *Oncogene.*, 22(31):4860-7.
- Kaynar, A. M., Bakalov, V., Laverde, S. M., Cambriel, A. I., Lee, B. H., Towheed, A., et al. (2016). Cost of surviving sepsis: a novel model of recovery from sepsis in Drosophila melanogaster. *Intensive Care Med Exp.*, 4(1):4.
- Kim, C. H., Kim, S. J., Kan, H., Kwon, H. M., Roh, K. B., Jiang, R., et al. (2008). A three-step proteolytic cascade mediates the activation of the peptidoglycan-induced toll pathway in an insect. *J Biol Chem.*, 283(12):7599-607.
- Kim, L. K., Choi, U. Y., Cho, H. S., Lee, J. S., Lee, W. B., Kim, J., et al. (2007). Down-regulation of NF-kappaB target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in Drosophila. *PLoS Biol.*, 5(9):e238.
- Kim, M. J., & Choe, K. M. (2014). Basement membrane and cell integrity of self-tissues in maintaining Drosophila immunological tolerance. *PLoS Genet.*, 10(10):e1004683.
- Kim, M. S., Byun, M., & Oh, B. H. (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from Drosophila melanogaster. *Nat Immunol.*, 4(8):787-93.
- Kim, M., Lee, J. H., Lee, S. Y., Kim, E., & Chung, J. (2006). Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(44):16358-63.
- Kim, S. H., Park, S. Y., Heo, Y. J., & Cho, Y. H. (2008). Drosophila melanogaster-based screening for multihost virulence factors of Pseudomonas aeruginosa PA14 and identification of a virulence-attenuating factor, HudA. *Infect Immun.*, 76(9):4152-62.
- Kim, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W. B., Kim, J., Song, Y. H., et al. (2005). Downregulation of lipopolysaccharide response in Drosophila by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol.*, 6(2):211-8.
- Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors.*, 30(2):88-106.
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., et al. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.*, 308(5720):385-9.
- Kleino, A., Myllymäki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L. M., Oksanen, K., Ulvila, J., et al. (2008). Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. *J Immunol.*, 180(8):5413-22.

- Kockel, L., Homsy, J. G., & Bohmann, D. (2001). Drosophila AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene.*, 20(19):2347-64.
- Kong, A., Masson, G., Frigge, M. L., Gylfason, A., Zusmanovich, P., Thorleifsson, G., et al. (2008). Detection of sharing by descent, long-range phasing and haplotype imputation. *Nat Genet.*, 40(9):1068-75.
- Kono, H., Onda, A., & Yanagida, T. (2014). Molecular determinants of sterile inflammation. *Current Opinion in Immunology*, vol.26, no. 1, pp. 147–156, 2014.
- Kotsyfakis, M., Ehret-Sabatier, L., Siden-Kiamos, I., Mendoza, J., Sinden, R. E., & Louis, C. (2005). Plasmodium berghei ookinetes bind to Anopheles gambiae and Drosophila melanogaster annexins. *Mol Microbiol.*, 57(1):171-9.
- Kounatidis, I., & Ligoxygakis, P. (2012). Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol.*, 2(5):120075. .
- Krautz, R., Arefin, B., & Theopold, U. (2014). Damage signals in the insect immune response. *Front Plant Sci.*, 5:342.
- Krautz, R., Arefin, B., & Theopold, U. (2014). Damage signals in the insect immune response. *Front Plant Sci.* , 5:342.
- Krzemien, J., Crozatier, M., & Vincent, A. (2010). Ontogeny of the Drosophila larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *Int J Dev Biol.*, 54(6-7):1117-25.
- Kurata, S., Arika, S., & Kawabata, S. (2006). Recognition of pathogens and activation of immune responses in Drosophila and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology.*, 211(4):237-49.
- Kuttenkeuler, D., Pelte, N., Ragab, A., Gesellchen, V., Schneider, L., Blass, C., et al. (2010). A large-scale RNAi screen identifies Deaf1 as a regulator of innate immune responses in Drosophila. *J Innate Immun.*, 2(2):181-94.
- Lamaris, G. A., Ben-Ami, R., Lewis, R. E., Chamilos, G., Samonis, G., & Kontoyiannis, D. P. (2009). Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis.*, 199(9):1399-406.
- Lamaris, G. A., Chamilos, G., Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. (2007). Virulence studies of Scedosporium and Fusarium species in Drosophila melanogaster. *J Infect Dis.*, 196(12):1860-4.
- Lamothe, B., Besse, A., Campos, A. D., Webster, W. K., Wu, H., & Darnay, B. G. (2007). Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J Biol Chem.*, 282(6):4102-12.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.*, 9(4):357-9.

- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., & Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol.*, 230(2):243-57.
- Lau, G. W., Goumnerov, B. C., Walendziewicz, C. L., Hewitson, J., Xiao, W., Mahajan-Miklos, S., et al. (2003). The *Drosophila melanogaster* toll pathway participates in resistance to infection by the gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*, 71(7):4059-66.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.*, 86(6):973-83.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.*, 25:697-743.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(26):14614-9.
- Lesch, C., Jo, J., Wu, Y., Fish, G. S., & Galiko, M. J. (2010). A targeted UAS-RNAi screen in *Drosophila* larvae identifies wound closure genes regulating distinct cellular processes. *Genetics.*, 186(3):943-57.
- Lesur, I., Textoris, J., Lloriod, B., Courbon, C., Garcia, S., Leone, M., et al. (2010). Gene expression profiles characterize inflammation stages in the acute lung injury in mice. *PLoS One.*, 5(7):e11485.
- Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R., & Lemaitre, B. (2002). Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Curr Biol.*, 12(12):996-1000.
- Leulier, F., Marchal, C., Miletich, I., Limbourg-Bouchon, B., Benarous, R., & Lemaitre, B. (2003b). Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat-body cells inhibits Toll-dependent immune responses. *EMBO Rep.*, 4(10):976-81.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J. H., Caroff, M., Lee, W. J., et al. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol.*, 4(5):478-84.
- Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A., et al. (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science.*, 285(5435):1917-9.
- Lewontin, R. C., & Kojima, K. I. (1960). The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution*, 14, 458-472.
- Lhocine, N., Ribeiro, P. S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., et al. (2008). PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe.*, 4(2):147-58.

- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. (2002a). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science.*, 297(5578):114-6.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., et al. (2002). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO J.*, 21(23):6330-7.
- Lim, J. H., Kim, M. S., Kim, H. E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K., et al. (2006). Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J Biol Chem.*, 281(12):8286-95.
- Lindsay, S. A., & Wasserman, S. A. (2014). Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Dev Comp Immunol.* , 42(1):16-24.
- Lionakis, M. S., Lewis, R. E., May, G. S., Wiederhold, N. P., Albert, N. D., Halder, G., et al. (2005). Toll-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis.*, 191(7):1188-95.
- Lionakis, M. S., & Kontoyiannis, D. P. (2010). The growing promise of Toll-deficient *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus* pathogenesis and treatment. *Virulence.*, 1(6):488-99.
- Liu, X., Sano, T., Guan, Y., Nagata, S., Hoffmann, J. A., & Fukuyama, H. (2012). *Drosophila* EYA regulates the immune response against DNA through an evolutionarily conserved threonine phosphatase motif. *PLoS One.*, 7(8):e42725.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.*, 89(2):175-84.
- Lotfi, R., Schrezenmeier, H., & Lotze, M. T. (2009). Immunotherapy for cancer: promoting innate immunity. *Front Biosci (Landmark Ed).*, 14:818-32.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15(12):550.
- Luce-Fedrow, A., Von Ohlen, T., & Chapes, S. K. (2009). Ehrlichia chaffeensis infections in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun.*, 77(11):4815-26.
- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., & Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem.*, 395(2):203-30.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.*, 2(9):1051-60.
- Lyne, R., Smith, R., Rutherford, K., Wakeling, M., Varley, A., Guillier, F., et al. (2007). FlyMine: an integrated database for *Drosophila* and *Anopheles* genomics. *Genome Biol.*, 8(7):R129.
- Ma, X., Huang, J., Yang, L., Yang, Y., Li, W., & Xue, L. (2012). NOPO modulates Egr-induced JNK-independent cell death in *Drosophila*. *Cell Res.*, 22(2):425-31.

- Ma, X., Xu, W., Zhang, D., Yang, Y., Li, W., & Xue, L. (2015). Wallenda regulates JNK-mediated cell death in *Drosophila*. *Cell Death Dis.*, 6:e1737.
- Mackay, T. F., Richards, S., Stone, E. A., Barbadilla, A., Ayroles, J. F., Zhu, D., et al. (2012). The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel. *Nature.* , 482(7384):173-8.
- Majno G. (1991). The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis*, 163(5):937-45.
- Makki, R., Meister, M., Pannetier, D., Ubeda, J. M., Braun, A., Daburon, V., et al. (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biol.*, 8(8):e1000441.
- Márkus , R., Kurucz, E., Rus, F., & Andó , I. (2005). Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunol Lett.*, 101(1):108-11.
- Martín , F. A., Pérez-Garijo, A., & Morata, G. (2009). Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cells. *Int J Dev Biol.*, 53(8-10):1341-7.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky , A. M., et al. (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 12(4):557-70.
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., & Ringuette, M. (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci.*, 121(Pt 10):1671-80.
- Martinon , F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.*, 10(2):417-26.
- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296: 301–5.
- Maung, A. A., Fujimi, S., MacConmara, M. P., Tajima, G., McKenna, A. M., Delisle, A. J., et al. (2008). Injury enhances resistance to *Escherichia coli* infection by boosting innate immune system function. *J. Immunol*, 180: 2450–8.
- McIlroy , D., Tanaka , M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., et al. (2000). An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev.*, 14(5):549-58.
- Medzhitov , R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.*, 1(2):135-45.
- Medzhitov , R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.*, 454(7203):428-35.
- Meister, M. (2004). Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol.*, 16(1):10-5.
- Meister, M., & Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol.*, 5(9):573-80.
- Mellroth , P., Karlsson, J., Håkansson, J., Schultz, N., Goldman, W. E., & Steiner, H. (2005). Ligand-induced dimerization of *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(18):6455-60.

- Mellroth, P., Karlsson, J., & Steiner, H. (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem.*, 278(9):7059-64.
- Mellroth, P., Karlsson, J., & Steiner, H. (2003). A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem.*, 278(9):7059-64.
- Menozzi, P., Piazza, A., & Cavalli-Sforza, L. (1978). Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science.*, 201(4358):786-92.
- Ming, M., Obata, F., Kuranaga, E., & Miura, M. (2014). Persephone/Spätzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila*. *J Biol Chem.*, 289(11):7558-68.
- Mizushima, Y., Ueno, M., Idoguchi, K., Ishikawa, K., & Matsuoka, T. (2009). Fever in trauma patients: friend or foe? *J. Trauma*, 67: 1062–5.
- Moore, F., Moore, E., & Read, R. (1993). Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz.*, 1: 538–49.
- Moreira, S., Stramer, B., Evans, I., Wood, W., & Martin, P. (2010). Prioritization of competing damage and developmental signals by migrating macrophages in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol.*, 20(5):464-70.
- Moreno, E., Yan, M., & Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol.*, 12(14):1263-8.
- Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., & Nagata, S. (2002). Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes Dev.*, 16(20):2662-71.
- Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., Sakahira, H., & Nagata, S. (2000). Identification and developmental expression of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.*, 275(28):21402-8.
- Mulinari, S., Häcker, U., & Castillejo-López, C. (2006). Expression and regulation of Spätzle-processing enzyme in *Drosophila*. *FEBS Lett.*, 580(22):5406-10.
- Müller, P., Kuttenkeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M. P., & Boutros, M. (2005). Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature.*, 436(7052):871-5.
- Myllymäki, H., & Rämet, M. (2014). JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scand J Immunol.*, 79(6):377-85.
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J., & Calderwood, S. B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(24):15675-80.

- Mylonakis , E., Moreno, R., El Khoury, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S. B., et al. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.*, 73(7):3842-50.
- Nagano, M., Suzuki, H., Ui-Tei, K., Sato, S., Miyake, T., & Miyata, Y. (1998). H-7-induced apoptosis in the cells of a *Drosophila* neuronal cell line through affecting unidentified H-7-sensitive substance(s). *Neurosci Res.*, 31(2):113-21.
- Naitza , S., Rossé , C., Kappler , C., Georgel , P., Belvin , M., Gubb , D., et al. (2002). The *Drosophila* immune defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity.*, 17(5):575-81.
- Nam, H. J., Jang, I. H., You, H., Lee, K. A., & Lee, W. J. (2012). Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Haya protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. *EMBO J.*, 31(5):1253-65.
- Narasimamurthy, R., Geuking, P., Ingold, K., Willen, L., Schneider, P., & Basler, K. (2009). Structure-function analysis of Eiger, the *Drosophila* TNF homolog. *Cell Res.*, 19(3):392-4.
- Needham, A. J., Kibart, M., Crossley, H., Ingham, P. W., & Foster, S. J. (2004). *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology.*, 150(Pt 7):2347-55.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., et al. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.*, 13(15):3438-47.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(3). pii: a006049.
- Neyen, C., Poidevin, M., Roussel, A., & Lemaitre, B. (2012). Tissue- and ligand-specific sensing of gram-negative infection in *Drosophila* by PGRP-LC isoforms and PGRP-LE. *J Immunol.*, 189(4):1886-97.
- Nicolas, E., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., & Lemaitre, B. (1998). In vivo regulation of the I κ B homologue cactus during the immune response of *Drosophila*. *J Biol Chem.*, 273(17):10463-9.
- Niethammer , P., Grabher , C., Look, A. T., & Mitchison , T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature.*, 459(7249):996-9.
- Obata, F., Kuranaga , E., Tomioka , K., Ming, M., Takeishi , A., Chen, C. H., et al. (2014). Necrosis-driven systemic immune response alters SAM metabolism through the FOXO-GNMT axis. *Cell Rep.*, 7(3):821-33.
- Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Hashiguchi, N., Kuwagata, Y., Hosotsubo, H., et al. (1999). Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients. *J. Trauma*, 46: 774–81.

- Ohsawa, S., Sato, Y., Enomoto, M., Nakamura, M., Betsumiya, A., & Igaki, T. (2012). Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature*, 490(7421):547-51.
- Okabe, F., Nakagiri, Y., Yamada, T., & Kose, H. (2015). Laser induced injury caused hyperglycemia-like effect in *Drosophila* larva: a possible insect model for posttraumatic diabetes. *J Vet Med Sci*, 77(5):601-4.
- Oppenheim, J. J., & Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol*, 17: 359–65.
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H., & Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22):12596-601.
- Osuka, A., Ogura, H., Ueyama, M., Shimazu, T., & Lederer, J. A. (2014). Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis. *Acute Medicine & Surgery*, 1(2):63–69.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., & Franzoso, G. (2004). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci*, 117(Pt 22):5197-208.
- Paquette, N., Broemer, M., Aggarwal, K., Chen, L., Husson, M., Ertürk-Hasdemir, D., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF-kappaB signaling. *Mol Cell*, 37(2):172-82.
- Parisi, F., Stefanatos, R. K., Strathdee, K., Yu, Y., & Vidal, M. (2014). Transformed epithelia trigger non-tissue-autonomous tumor suppressor response by adipocytes via activation of Toll and Eiger/TNF signaling. *Cell Rep*, 6(5):855-67.
- Park, J. M., Brady, H., Ruocco, M. G., Sun, H., Williams, D., Lee, S. J., et al. (2004). Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev*, 18(5):584-94.
- Park, J. M., Kim, J. M., Kim, L. K., Kim, S. N., Kim-Ha, J., Kim, J. H., et al. (2003). Signal-induced transcriptional activation by Dif requires the dTRAP80 mediator module. *Mol Cell Biol*, 23(4):1358-67.
- Park, J. W., Kim, C. H., Kim, J. H., Je, B. R., Roh, K. B., Kim, S. J., et al. (2007). Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(16):6602-7.
- Park, M. Y., Jang, H. D., Lee, S. Y., Lee, K. J., & Kim, E. (2004). Fas-associated factor-1 inhibits nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activity by interfering with nuclear translocation of the RelA (p65) subunit of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 279(4):2544-9.
- Pastor-Pareja, J. C., & Xu, T. (2013). Dissecting social cell biology and tumors using *Drosophila* genetics. *Annu Rev Genet*, 47:51-74.

- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M., & Xu, T. (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech.*, 1(2-3):144-54.
- Paterson, H. M., Murphy, T. J., Purcell, E. J., Shelley, O., Kriynovich, S. J., Lien, E., et al. (2003). Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J. Immunol.*, 171: 1473–83.
- Pelte, N., Robertson, A. S., Zou, Z., Belorgey, D., Dafforn, T. R., Jiang, H., et al. (2006). Immune challenge induces N-terminal cleavage of the *Drosophila* serpin Necrotic. *Insect Biochem Mol Biol.*, 36(1):37-46.
- Peretz, G., Bakhrat, A., & Abdu, U. (2007). Expression of the *Drosophila melanogaster* GADD45 homolog (CG11086) affects egg asymmetric development that is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Genetics.*, 177(3):1691-702.
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., et al. (2004). In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem.*, 279(13):12848-53.
- Pradel, E., & Ewbank, J. J. (2004). Genetic models in pathogenesis. *Annu Rev Genet.*, 38:347-63.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.*, 81(3):559-75.
- Qin, Q. M., Luo, J., Lin, X., Pei, J., Li, L., Ficht, T. A., et al. (2011). Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.*, 7(6):e1002078.
- R Development Core Team. (2010). R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria*.
- Radyuk, S. N., Michalak, K., Klichko, V. I., Benes, J., & Orr, W. C. (2010). Peroxiredoxin 5 modulates immune response in *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta.*, 1800(11):1153-63.
- Rämet, M., Lanot, R., Zachary, D., & Manfruegli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol.*, 241(1):145-56.
- Rämet, M., Manfruegli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., & Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature.*, 416(6881):644-8.
- Ranieri, V. M., Thompson, B. T., Barie, P. S., Dhainot, J. F., Douglas, I. S., Finfer, S., et al. (2012). Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med.*, 366(22):2055-64.
- Razzell, W., Evans, I. R., Martin, P., & Wood, W. (2013). Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Curr Biol.*, 23(5):424-9.

- Razzell, W., Wood, W., & Martin, P. (2011). Swatting flies: modelling wound healing and inflammation in *Drosophila*. *Dis Model Mech.*, 4(5):569-74.
- Reed, D. E., Huang, X. M., Wohlschlegel, J. A., Levine, M. S., & Senger, K. (2008). DEAF-1 regulates immunity gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(24):8351-6.
- Rizki, T. M., & Rizki, R. M. (1980). Developmental analysis of a temperature-sensitive melanotic tumor mutant in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, vol. 189, no. 3, pp. 197–206.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.*, 26(1):139-40.
- Royet, J., & Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol.*, 5(4):264-77.
- Rubin, G. M., & Spradling, A. C. (1983). Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.*, 11(18):6341-51.
- Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, H. Y., Bai, J. Y., Nam, Y. D., Bae, J. W., et al. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science.*, 319(5864):777-82.
- Saeed, A. T., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.*, 34(2):374-8.
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.*, 391(6662):96-9.
- Santabábara-Ruiz, P., López-Santillán, M., Martínez-Rodríguez, I., Binagui-Casas, A., Pérez, L., Milán, M., et al. (2015). ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration. *PLoS Genet.*, 11(10):e1005595.
- Sauaia, A., Moore, F. A., Moore, E. E., & Lezotte, D. C. (1996). Early risk factors for postinjury multiple organ failure. *World J Surg.*, 20(4):392-400.
- Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem.*, 289(51):35237-45.
- Schleifer KH and Kandler O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.*, 36(4):407-77.
- Schmid, M. R., Anderl, I., Vesala, L., Vanha-aho, L. M., Deng, X. J., Rämetsä, M., et al. (2014). Control of *Drosophila* blood cell activation via Toll signaling in the fat body. *PLoS One.*, 9(8):e102568.
- Schneider, D., & Shahabuddin, M. (2000). Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science.*, 288(5475):2376-9.
- Schneider, D. S., Ayres, J. S., Brandt, S. M., Costa, A., Dionne, M. S., Gordon, M. D., et al. (2007). *Drosophila eiger* mutants are sensitive to extracellular pathogens. *PLoS Pathog.*, 3(3):e41.

- Senger, K., Harris, K., & Levine, M. (2006). GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(43):15957-62.
- Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Bker, H. V., Xu, W., et al. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(9):3507-12.
- Serio, A. W., Jeng, R. L., Haglund, C. M., Reed, S. C., & Welch, M. D. (2010). Defining a core set of actin cytoskeletal proteins critical for actin-based motility of *Rickettsia*. *Cell Host Microbe.*, 7(5):388-98.
- Sessions, O. M., Barrows, N. J., Souza-Neto, J. A., Robinson, T. J., Hershey, C. L., Rodgers, M. A., et al. (2009). Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature.*, 458(7241):1047-50.
- Shaukat, Z., Liu, D., Choo, A., Hussain, R., O'Keefe, L., Richards, R., et al. (2015). Chromosomal instability causes sensitivity to metabolic stress. *Oncogene.*, 34(31):4044-55.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., et al. (2003). Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J Biol Chem.*, 278(49):48928-34.
- Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C., Wilson, C., Davis, R. J., et al. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 10(21):2745-58.
- Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C., Wilson, C., Davis, R. J., et al. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 10(21):2745-58.
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.*, 10(1):23-8.
- Soukas, A., Cohen, P., Socci, N. D., & Friedman, J. M. (2000). Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.*, 14(8):963-80.
- Steenbergen, J. N., Nosanchuk, J. D., Malliaris, S. D., & Casadevall, A. (2003). *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun.*, 71(9):4862-72.
- Stokes, B. A., Yadav, S., Shokal, U., Smith, L. C., & Eleftherianos, I. (2015). Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front Microbiol.*, 6:19. .
- Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., et al. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(10):5991-6.
- Stramer, B., Winfield, M., Shaw, T., Millard, T. H., Woolner, S., & Martin, P. (2008). Gene induction following wounding of wild-type versus macrophage-deficient *Drosophila* embryos. *EMBO Rep.*, 9(5):465-71.

- Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M., et al. (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol.*, 168(4):567-73.
- Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Johnson, A. D. (2006). Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.*, 4(1):e4.
- Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G., & Wasserman, S. A. (2002). A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(20):12871-6.
- Sun, H., Towb, P., Chiem, D. N., Foster, B. A., & Wasserman, S. A. (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *EMBO J.*, 23(1):100-10.
- Tabuchi, Y., Shiratsuchi, A., Kurokawa, K., Gong, J. H., Sekimizu, K., Lee, B. L., et al. (2010). Inhibitory role for D-alanylation of wall teichoic acid in activation of insect Toll pathway by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.*, 185(4):2424-31.
- Takao, K., & Miyakawa, T. (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112(4):1167-72.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., & Kurata, S. (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.*, 23(23):4690-700.
- Tan, S. Y., & Dee, M. K. (2009). Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Med J.*, 50(5):456-7.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A., & Imler, J. L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol.*, 3(1):91-7.
- Theopold, U., Krautz, R., & Dushay, M. S. (2014). The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals. *Dev Comp Immunol.*, 42(1):42-6.
- Theopold, U., Schmidt, O., Söderhäll, K., & Dushay, M. S. (2004). Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.*, 25(6):289-94.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., et al. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet.*, 36(3):283-7.
- Tsuda, M., Langmann, C., Harden, N., & Aigaki, T. (2005). The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep.*, 6(11):1082-7.
- Tsung, A., Tohme, S., & Billiar, T. R. (2014). High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J Intern Med.*, 276(5):425-43.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., et al. (2009). FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.*, 37(Database issue):D555-9. doi: 10.1093/nar/gkn788.

- Venken, K. J., & Bellen, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet.*, 6(3):167-78.
- Venken, K. J., He, Y., Hoskins, R. A., & Bellen, H. J. (2006). P[acman]: a BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science.*, 314(5806):1747-51.
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., & Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev.*, 15(15):1900-12.
- Vlisidou, I., Dowling, A. J., Evans, I. R., Waterfield, N., French-Constant, R. H., & Wood, W. (2009). *Drosophila* embryos as model systems for monitoring bacterial infection in real time. *PLoS Pathog.*, 5(7):e1000518.
- Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B., & Boccard, F. (2004). *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.*, 12(5):235-42.
- Wafaisade, Lefering, Bouillon, Sakka, Thamm, Paffrath, et al. (2011). Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: an analysis of 29,829 patients from the Trauma. *Crit Care Med.*, (4):621-8.
- Wang, L., Kounatidis, I., & Ligoxygakis, P. (2014). *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Front Cell Infect Microbiol.*, 3:113.
- Wang, L., Weber, A. N., Atilano, M. L., Filipe, S. R., Gay, N. J., & Ligoxygakis, P. (2006). Sensing of Gram-positive bacteria in *Drosophila*: GGBP1 is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA. *EMBO J.*, 25(20):5005-14.
- Wang, W. Y., Barratt, B. J., Clayton, D. G., & Todd, J. A. (2005). Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.*, 6(2):109-18.
- Werner, T., Borge-Renberg, K., Mellroth, P., Steiner, H., & Hultmark, D. (2003). Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem.*, 278(29):26319-22.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., & Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(25):13772-7.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., & Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(25):13772-7.
- Whalen AM and Steward R. (1993). Dissociation of the dorsal-cactus complex and phosphorylation of the dorsal protein correlate with the nuclear localization of dorsal. *J Cell Biol.*, 123(3):523-34.
- Williams, J., Boin, N. G., Valera, J. M., & Johnson, a. N. (2015). Noncanonical roles for Tropomyosin during myogenesis. *Development.*, 142(19):3440-52.

- Wu, H., Wang, M. C., & Bohmann, D. (2009). JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mech Dev.*, 126(8-9):624-37.
- Wu, S. C., Liao, C. W., Pan, R. L., & Juang, J. L. (2012). Infection-induced intestinal oxidative stress triggers organ-to-organ immunological communication in *Drosophila*. *Cell Host Microbe.*, 11(4):410-7.
- Yan, J., Yang, X., Mortin, M. A., & Shahabuddin, M. (2009). Malaria sporozoite antigen-directed genome-wide response in transgenic *Drosophila*. *Genesis.*, 47(3):196-203.
- Yang, Y., Hou, L., Li, Y., Ni, J., & Liu, L. (2013). Neuronal necrosis and spreading death in a *Drosophila* genetic model. *Cell Death Dis.*, 11;4:e723.
- Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., et al. (2008). Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. *Nat Immunol.*, 9(8):908-16.
- Yokoyama, H., Mukae, N., Sakahira, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2000). A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.*, 275(17):12978-86.
- Yurchenco, P. D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3(2).
- Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M. S., Blanot, D., et al. (2006). The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity.*, 24(4):463-73.
- Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D. T., et al. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell.*, 124(3):587-99.
- Zhuang, Z. H., Sun, L., Kong, L., Hu, J. H., Yu, M. C., Reinach, P., et al. (2006). *Drosophila* TAB2 is required for the immune activation of JNK and NF-kappaB. *Cell Signal.*, 18(7):964-70.

Résumé

Etude de l'interaction entre inflammation et infection chez la drosophile.

Les infections post-traumatiques restent aujourd'hui encore l'une des premières causes de mortalité dans le monde. L'inflammation excessive sous-jacente aux blessures altère la réponse du système immunitaire et prédispose les patients à une réponse inappropriée aux infections opportunistes. Cette dérégulation entraîne un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) qui, associé à une infection, conduit à l'apparition du sepsis pouvant évoluer vers de lourds dommages des organes menant souvent à la mort. Comprendre les événements moléculaires mis en jeu lors de telles complications reste un défi majeur. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'interaction inflammation/infection, qui est au cœur du syndrome du sepsis. Mon but a été d'étudier les processus biologiques sous-jacents à la susceptibilité accrue à une infection d'un organisme en état inflammatoire activé. L'immunité innée étant la première ligne de défense qui coordonne les réponses à la blessure et à l'infection, c'est à cette partie du système que je me suis intéressé. Cette immunité innée étant conservée chez la drosophile, j'ai établi mon modèle d'étude dans cet organisme modèle. Celui-ci consiste à induire une blessure aseptique (inflammation) sur le thorax de drosophiles femelles âgées de 7 à 10 jours et d'induire une infection, par pique également, avec la bactérie à Gram-négatif *Pseudomonas entomophila*. Cette expérience dite de « double-hit » révèle que des mouches blessées sont moins résistantes à l'infection que celles n'ayant pas reçu de blessure, ce qui suggère que, chez la drosophile aussi, la capacité à se défendre face à un pathogène peut être altérée par l'existence d'un état inflammatoire préexistant. Nous avons analysé grâce à une étude transcriptomique (séquençage des ARN messagers), la cinétique des événements moléculaires précoces mis en jeu suite à un trauma précédant une infection. L'analyse des gènes différentiellement exprimés a révélé pour les mouches blessées puis infectées, une plus grande réponse au stress, une moins bonne réponse à l'infection et, pour la première fois à notre connaissance, l'implication du facteur de transcription CrebA dans la susceptibilité accrue à l'infection des mouches blessées. Nous avons également montré l'implication du récepteur au TNF Grindelwald (Grnd) dans la réponse immunitaire innée. J'ai aussi réalisé au cours de ma thèse des études d'associations génétiques pangénomiques (GWAS) effectuées à partir de données collectées chez des patients reçus à l'hôpital en raison d'infection et analysé l'association de polymorphismes nucléotidiques avec la survenue d'un choc septique. J'ai par ailleurs réalisé les analyses statistiques d'une étude transcriptomique par hybridation sur puce à ADN de sang de patients atteints du syndrome Sézary, une forme agressive de lymphome T cutané.

Abstract

Interaction between inflammation and infection in drosophila.

Post-traumatic infections are still one of the leading causes of mortality worldwide. Injury induced excessive inflammation alters the immune response and predispose the patients to opportunistic subsequent infections. This deregulation may lead to the development of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which, when associated with an infection, leads to the development of the sepsis syndrome with multiple organ dysfunctions. Understanding biological processes underlying those complications is still a major challenge. During my thesis, I was interested in the interaction between inflammation and infection, which is at the heart of the sepsis syndrome. My objective was to analyze the biological processes underlying the higher susceptibility of an organism that displays an activated inflammatory state. Being the first line of defense that coordinates the responses to injury and infection, I have focused my work on innate immunity. Because of its conservation with that of drosophila, I have decided to set up my model of study in this model organism. Thus, I have induced an aseptic wound to the thorax of 7 to 10 days adult female flies by needle pricking (inflammation), and then, an infection, also by needle pricking, with the Gram-negative bacterium *Pseudomonas entomophila*. This so called “double-hit” experiment reveals that wounded flies are less resistant to an infection when compared to infected flies only, suggesting that, in drosophila too, the ability to fight against a pathogen is altered by a preexisting inflammatory state. We have also investigated the transcriptome landscape of the different groups of flies by RNA sequencing and thus the kinetics of the early molecular events involved after a trauma prior to an infection. Differentially expressed genes revealed a higher stress response, a lower response to infection and, for the first time to our knowledge, the involvement of the transcription factor CrebA in the higher susceptibility of wounded flies upon infection. We also unraveled the implication of the TNF receptor Grindelwald (Grnd) in the innate immune response. During my thesis, I was also involved in genome wide association studies (GWAS) with data collected from patients that were received at hospitals because of infections and analyzed the association of single nucleotide polymorphisms with the occurrence of a septic shock. I have also performed the statistical analysis of a transcriptomic study by microarray of the blood of patients with Sézary syndrome, an aggressive epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma (CTCL).