



**THÈSE DE DOCTORAT
AIX MARSEILLE UNIVERSITÉ**

Spécialité

Sciences du vivant

École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par

Arnaud DEFAYE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ AIX MARSEILLE

Intitulée

Étude des interactions hôte - microbes chez la drosophile

Effectuée sous la direction du Dr. François LEULIER
en co-direction avec le Pr. Julien ROYET

Soutenue le 28 Septembre 2012, devant le jury composé de :

M. François LEULIER	Directeur de thèse
M. Julien ROYET	Co-directeur de thèse
M. Abdelaziz HEDDI	Rapporteur
Mme. Marie-Odile FAUVARQUE	Rapporteur
Mme. Nathalie PUJOL	Examineur
M. Pascal RIHET	Examineur

Remerciements

Pour commencer je tiens particulièrement à remercier François Leulier, qui a accepté de me coacher pendant ces 4 années. Un grand merci - et bravo ! - pour ta disponibilité, ta sympathie, ta diplomatie, ton dynamisme et ta patience. Tu t'es efforcé de tirer le meilleur de moi-même, et j'en suis le premier bénéficiaire. Une thèse c'est aussi une expérience humaine, et si j'en garde un beau souvenir ce sera en grande partie grâce à toi.

Evidemment, je n'aurais pas vécu tout cela si Julien Royet ne m'avait pas accepté au sein de son équipe. Un grand merci donc, pour m'avoir donné cette chance. Je n'oublierai jamais avec quelle générosité tu m'as accueilli aux premiers pas de cette aventure.

Je remercie également l'Association pour la Recherche sur le Cancer qui m'a soutenu financièrement pour la dernière année de ma thèse.

Je garde en mémoire la bonne ambiance qui régnait dans les couloirs du Centre de Génétique Moléculaire du CNRS à Gif-sur-Yvette, où j'ai commencé ma thèse. Je remercie chaleureusement tous ceux qui en étaient les architectes. Je pense notamment à Nouara, Asma, Sophie, Isabelle, Audrey, Pierre, Antoine, Mathilde, Mickaël, Fabien, Marie ; ainsi qu'aux nombreuses personnes qui, plus largement au CGM, ont rendu mon temps passé dans cet institut agréable (Christian, Sylvain, Aurélie, et tous les autres).

Je remercie vivement les membres actuels et passés de l'équipe Royet pour leur sympathie mais aussi pour tout ce que j'ai pu apprendre à leur contact. Bernard, Thomas, Karine, Idir, Ahmed, Marc, Berra, Gilles, Mélanie et Virginie. Je n'oublie pas non plus les stagiaires qui nous ont cotoyé pour un temps et qui ont apporté de la bonne humeur au laboratoire : en particulier Mélanie M. et Delphine P.

Dans les mêmes murs mais la porte à côté, je remercie sincèrement Laurent pour son amitié et ses apports influents dans mon travail. Je remercie aussi Diogo, Cathy, Yanina, Jessica et Justine pour leur sympathie.

Le déroulement de ma thèse a engendré un déménagement, et il a fallu tisser de nouveaux contacts dans une ville qui m'était inconnue. Ma vie à Marseille n'aurait jamais été aussi belle sans l'amitié offerte par les membres de l'ADD Marseille Sud, Marc, Khaled-Ezaheir, Charlène, et Georges. Encore une fois, merci à vous tous.

Je remercie de tout cœur ma famille, qui m'a accompagné et soutenu dans cette démarche (comme dans toutes les autres) en m'apportant un amour inconditionnel. Je ne souhaite pas m'étendre ici, mais vous savez la valeur que vous avez à mes yeux.

Je remercie aussi Benjamin Prud'homme, Aziz Moqrich et Nathalie Pujol pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, d'avoir consacré du temps pour moi et de m'avoir donné des recommandations utiles. Enfin, je remercie les membres du jury, qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail.

Résumé

Parce qu'ils sont constamment en contact avec toutes sortes de microorganismes présents dans leur environnement, les organismes pluricellulaires ont développé un système immunitaire qui leur permet de détecter leur présence et contrôler leur croissance. Les contacts se produisent naturellement au niveau des surfaces de l'animal qui sont exposés à l'environnement extérieur, comme la peau ou les muqueuses. Il existe au minimum deux types d'interactions : dans le premier cas, la présence de l'autre ne cause aucun problème pour chacun, et peut même éventuellement apporter un bénéfice. Dans le second, l'un des partenaires est agressif envers l'autre, qui doit répondre à cette situation de stress en essayant de préserver son intégrité pour assurer sa survie. Du côté de l'hôte, cette réponse implique le système immunitaire et a généralement pour but de détruire le microorganisme. En utilisant l'insecte *Drosophila melanogaster* comme organisme hôte modèle, j'ai étudié les interactions hôtes - microbes.

Dans le cadre d'un premier projet, je me suis intéressé aux cellules circulantes de la drosophile, les plasmotocytes. Nous savions qu'elles sont capables de manifester certaines activités biologiques (sécrétion de cytokine et de facteurs coagulant, phagocytose), mais leur importance dans la résistance aux infections n'a jamais été évaluée. En générant des drosophiles dépourvues de plasmotocytes, j'ai pu montrer que ces cellules sont requises pour assurer la résistance à certaines infections bactériennes systémiques chez l'adulte, dont *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*, mais pas toutes. J'ai aussi confirmé le rôle essentiel du gène *eater*, qui code une protéine transmembranaire requise pour la phagocytose de *Staphylococcus aureus*, dans la résistance aux infections par cette bactérie.

Dans le cadre d'un second projet, je me suis intéressé aux interactions hôte - microbes en dehors des situations d'infections. Je voulais étudier l'impact de la présence d'une communauté bactérienne commensale sur la biologie de la drosophile, et mesurer l'influence que le système immunitaire de l'animal exerce sur les phénomènes dus à la présence de la flore, s'il y en a. J'ai commencé par identifier les espèces bactériennes qui, au sein de notre laboratoire, sont naturellement associées à la drosophile. J'ai identifié 6 espèces, dont 3 majeures par leur niveau de présence (*Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus viridans*), et 3 qui sont détectées à des niveaux plus faibles (*Corynebacterium nuruki*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ochrobactrum pseudogrignone*). J'ai ensuite quantifié les charges bactériennes à l'intérieur des drosophiles, qui sont apparues très variables d'un individu à l'autre. Puisque mon objectif initial est d'évaluer l'impact de la flore commensale sur son hôte, j'ai émis l'hypothèse que les effets que la flore peut éventuellement exercer sur la biologie de son hôte dépend de la quantité de cellules bactériennes présentes dans le corps de l'animal. Par conséquent, j'ai décidé de mettre au point un processus de standardisation de la flore bactérienne des drosophiles, qui rendrait homogène qualitativement et quantitativement la composition de la flore entre individus. Cet objectif a été atteint en élevant les insectes dans un environnement stérile, puis en conservant pendant une semaine les adultes émergents sur une nourriture supplémentée d'un cocktail de 4 espèces bactérienne commensales connues présentes en quantité maîtrisée.

J'ai commencé à évaluer l'impact de cette flore bactérienne standardisée sur la biologie de la drosophile, notamment sur l'intégrité de son épithélium intestinal et sa physiologie générale. Il en résulte que les bactéries commensales modulent le métabolisme des acides aminés de leur hôte en augmentant le niveau d'expression de nombreux gènes codant des protéases. L'activité du système immunitaire à l'encontre de cette population microbienne doit être maintenue sous un contrôle strict afin d'éviter des effets délétaires pour l'épithélium intestinal. De plus, il semble que le système immunitaire soit lié dans une certaine mesure à la régulation du métabolisme de l'animal, en particulier la régulation de l'appétit.

A l'issue de ce travail, nous avons une meilleure compréhension de la façon dont la drosophile répond aux infections systémiques chez l'adulte, et comment la communauté bactérienne locale affecte la qualité de vie de la drosophile en absence d'infections. L'utilisation de la drosophile comme organisme modèle pour l'étude des interactions hôtes - microbes est pertinente et peut encore être optimisée pour étudier plus en détails les acteurs génétiques et moléculaires qui médient les impacts de la flore sur le métabolisme de son hôte.

Abstract

Because they are constantly exposed to contact with the various type of microorganisms present in their environment, multicellular organisms have evolved an immune system that allow them to sense their presence and control their growth. Close contact with these microbes naturally occurs in body parts that are exposed to the environment, like external body surfaces and internal mucosa, and at least two different kind of relations can be described. In the first case both the two parts do not harm the other, eventually allowing the relationship to go for a mutual benefit. In the second case, one part is aggressive towards the other and lead it to induce a response to this stressful situation in order to preserve it's integrity and ultimately it's survival. From the host point of view, this response involves the immune system and most frequently aims at the eradication of the microbes. Using the fruitfly *drosophila melanogaster* as a model for the host side, i was interested in studying host-microbe interactions.

A first project i worked on focused on *drosophila* circulating cells, the plasmatocytes, about which we knew some activities (secretion of cytokines, clotting factors, phagocytosis) but whose functional relevance to resist infection has never been tested. By generating plasmatocytes-depleted flies, I show that these cells are required for the survival of the adult upon some type of systemic bacterial infections, including *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*, but not all. I further show that the expression of *eater*, a gene encoding a transmembrane protein required for the phagocytosis of *Staphylococcus aureus*, is required in plasmatocytes for the animal to survive the infection.

As a second project, i turned to the study of host – microbe interactions in absence of infection, *namely to the study of commensalism*. I was interested in studying the impact of the commensal bacteria community associated with the flies on the biology of its host, and to check whether the *drosophila* immune system exert an influence on the flora-induced phenomena, if any. I first identified the bacterial species which are naturally associated with the *drosophila* lines i keep in the laboratory. I recovered 6 species, 3 of which are major components as they are highly prevalent (*Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus viridans*), and the remaining 3 only occurred at low level (*Corynebacterium nuruki*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ochrobactrum pseudogrignonense*). I then quantified the bacterial load in the flies, which appeared highly variable among individual. My initial objective was to evaluate the impact of the commensal flora on its host, and i made the assumption that the extent to which bacteria affect *drosophila* may depend on the number of bacterial cells found in the body cavity of *drosophila*. As a consequence, i decided to set up a process that would standardize the composition and load of each fly's bacterial flora. This basically was achieved by raising flies in axenic condition, and incubating the newly emerged adults for one week on a food supplemented with a cocktail of 4 known commensal bacterial species at precise concentration.

I started to evaluate the influence of the fly's standardized bacterial flora on the homeostasis of its intestinal epithelium and overall physiology. It appeared that the commensal bacteria modulate the amino acid metabolism of its host, by increasing the expression of several protease encoding genes. The activity of the immune system toward this community should be kept under tight control to avoid deleterious effect on the intestinal epithelium. Furthermore, the immune system may be linked to some extent to the regulation of food intake.

Through this work, we now have a better understanding of how *drosophila* react to bacterial infection, and how the local community of bacteria affect *drosophila*'s quality of life in absence of infection. The use of *drosophila* as a model organism to study host – microbe interaction has proven useful, and may still be optimized to further dissect the genetic and molecular basis of host microbe interactions.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Préambule	1
1.2	Les interactions hôtes - microorganismes	1
1.3	Un système de défense contre les infections	2
1.4	Aspect historique de la recherche en immunologie	3
1.5	Un modèle d'étude : l'insecte <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.6	Le système immunitaire de la drosophile	6
1.6.1	Des barrières physiques limitent les contacts entre les cellules de la drosophile et les particules de l'environnement	6
1.6.2	Des barrières biochimiques protègent les surfaces épithéliales	6
1.6.2.1	Une zone acide dans l'intestin moyen	6
1.6.2.2	Un équipement protéolytique dirigé contre les molécules bactériennes	6
1.6.2.3	Les espèces réactives de l'oxygène	8
1.6.2.4	Les peptides antimicrobiens	9
1.6.2.5	Des partenaires étrangers	9
1.6.3	La réponse cellulaire	10
1.6.3.1	Les hémocytes, cellules circulantes de la drosophile	10
1.6.3.2	La phagocytose par les plasmatocytes	10
1.6.3.3	L'encapsulation par les lamellocytes	10
1.6.4	Coagulation et mélanisation	13
1.6.4.1	La coagulation	13
1.6.4.2	La mélanisation	13
1.6.5	La reconnaissance microbienne et la production de peptides antimicrobiens	16
1.6.5.1	Détection des microorganismes	16
1.6.5.2	Activation des voies de signalisation Toll et IMD	17
1.6.6	La réponse immunitaire aux infections systémiques	18
1.7	Objectif de mon travail de thèse	19
2	Matériels et Méthodes	22
2.1	Maintien des lignées de drosophiles	22
2.1.1	Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette	22
2.1.2	Institut de Biologie du Développement de Marseille Luminy, Marseille	22
2.1.3	Cultures axéniques	22
2.2	Expériences de longévité	23
2.3	Cultures bactériennes	23
2.4	Recolonisation	23

2.5	Mesure des charges bactériennes	24
2.6	Crible génétique par ARN interférence dans les hémocytes	24
2.7	Création et analyse des banques de séquences codant l'ARNr 16S isolées à partir des drosophiles	25
2.8	Homeostasie de l'épithélium intestinal en réponse à divers stress	27
2.9	Analyse de la physiologie intestinale	28
2.10	Mesure de la capacité de contenance de nourriture des drosophiles	28
2.11	Le test CAFE	29
2.12	Analyse du transcriptome	29
2.13	Confirmation des données issues de l'analyse du transcriptome par Q-PCR	30
3	Infection	31
3.1	Introduction	31
3.2	Résultats	31
3.2.1	Résultats publiés	32
3.2.1.1	Inclusion de l'article 1	32
3.2.1.2	Discussion	46
3.2.2	Crible de gènes candidats potentiellement impliqués dans la phagocytose .	49
3.2.2.1	Introduction	49
3.2.2.2	Résultats et discussion	50
3.2.2.3	Conclusion	55
3.2.3	Longévité	57
3.2.3.1	Introduction	57
3.2.3.2	Résultats et discussion	57
3.3	Conclusion	60
4	Commensalisme	62
4.1	Introduction	62
4.2	Caractérisation de la flore commensale des drosophiles adultes.	63
4.2.1	Introduction	63
4.2.2	Analyse qualitative de la flore microbienne associée aux individus élevés en condition conventionnelle	63
4.2.2.1	Démarche expérimentale	63
4.2.2.2	Résultats	64
4.2.2.3	Conclusion	69
4.2.3	Analyse quantitative de la flore microbienne des individus élevés en condition conventionnelle	74
4.2.3.1	Objectif	74
4.2.3.2	Méthode	74
4.2.3.3	Charges bactériennes des drosophiles élevées en condition conventionnelle	74
4.3	Mise en place d'un nouveau modèle expérimental.	76
4.3.1	Introduction	76
4.3.2	Mise au point d'un processus de recolonisation des individus axéniques adultes.	77
4.3.3	Conclusion	79
4.4	Étude de l'homéostasie de l'épithélium intestinal en réponse à divers stress	80
4.4.1	Introduction	80
4.4.2	Résultats et discussion	85

4.4.2.1	Réponse à l'ingestion de bactéries	85
4.4.2.2	Réponse à l'ingestion d'une molécule toxique	85
4.4.2.3	Résultats publiés par une autre équipe	86
4.4.3	Conclusion	87
4.5	Analyse de la physiologie intestinale	87
4.5.1	Introduction	87
4.5.2	Résultats et discussion	88
4.5.2.1	Impact de la présence d'une flore et d'une infection intestinale .	88
4.5.2.2	Impact de la perte de régulateurs négatifs de la voie de signalisation IMD	88
4.5.2.3	Les mutants consomment moins de nourriture que les sauvages .	89
4.5.2.4	Discussion	89
4.5.3	Conclusion	90
4.6	Analyse du transcriptome	97
4.6.1	Introduction	97
4.6.2	Méthodologie	97
4.6.3	Résultats	98
4.6.3.1	Listes de gènes dérégulés en réponse aux variations d'état des paramètres expérimentaux	98
4.6.3.2	Identification de facteurs de transcription potentiellement associés aux gènes dérégulés	101
4.6.3.3	Validation des données obtenues	102
4.6.4	Conclusion	104
4.7	Conclusion	112
5	Conclusions	114
5.1	Les mécanismes de défense de la drosophile lors d'infections systémiques	114
5.2	Manipulation de la flore commensale	115
5.3	La théorie de l'évolution animale sous forme d'holobionte	115
5.4	La nécessité de caractériser la flore intestinale et étudier son impact fonctionnel sur l'hôte	116
5.5	Le besoin d'un modèle simpliste	117
5.6	Remarques conclusives sur les relations hôtes - microbes	117
6	Annexes	119
6.1	Carte du vecteur PGEM-T Easy	120
6.2	Article 2	121
6.3	Dispositif expérimental de l'analyse de la physiologie intestinale	134
6.4	Présentation du système colorimétrique TSL	135
6.5	Impact du genre et du régime alimentaire sur la luminance des déjections de drosophiles	136
6.6	Charges bactériennes des drosophiles en fin d'analyse de la physiologie intestinale en présence ou absence de flore	137
6.7	Charges bactériennes des drosophiles en fin d'analyse de la physiologie intestinale en présence ou absence d'infection bactérienne	138
6.8	Analyses statistiques des données de la partie Physiologie Intestinale	139
6.9	Informations relatives à la section 4.6 du chapitre Commensalisme	140

Table des figures

1.1	Les voies d'évolution possibles d'une infection	2
1.2	Le cycle de vie de la drosophile	5
1.3	Les barrières physiques de la drosophiles adulte	7
1.4	Schéma du tube digestif adulte de la drosophile.	8
1.5	Les cellules circulantes de la drosophile	11
1.6	La phagocytose chez la drosophile	12
1.7	L'encapsulation des oeufs de guêpes parasites	14
1.8	Coagulation <i>ex vivo</i> de l'hémolymph de la larve de drosophile	15
1.9	Réaction de mélanisation chez la drosophile	16
1.10	La structure des deux types de peptidoglycanes	17
1.11	Les voies de signalisation Toll et IMD	20
1.12	Vue d'ensemble des défenses de la drosophile adulte.	21
2.1	Méthode d'identification des espèces bactériennes de la flore commensale des drosophiles par séquençage du gène codant l'ARNr 16S.	26
3.1	Exemples de résultats positif et négatif obtenus lors du crible de gènes impliqués dans la résistance aux infections par <i>S. aureus</i>	56
3.2	Longévité des individus Hemoless et contrôles en condition conventionnelle ou axénique.	58
4.1	Courbes de rarefaction des 4 banques de séquences.	67
4.2	Phylogénie des espèces présentes dans les drosophiles sauvages entières.	70
4.3	Phylogénie des espèces présentes dans les intestins de drosophiles sauvages.	71
4.4	Phylogénie des espèces présentes dans les drosophiles <i>pims^{Ey}</i> entières.	72
4.5	Phylogénie des espèces présentes dans les intestins de drosophiles <i>pims^{Ey}</i>	73
4.6	Evolution de la charge bactérienne des mouches élevées en condition conventionnelle depuis l'émergence et pendant 4 jours ainsi que de leur milieu	75
4.7	Charge bactérienne des femelles à 72h après inoculation de diverses quantités de <i>L. plantarum</i> ou <i>E. faecalis</i> dans le milieu nutritif	78
4.8	Evolution de la charge bactérienne après inoculation du milieu par <i>L. plantarum</i> ou <i>E. faecalis</i>	79
4.9	Evolution de la charge bactérienne pendant 7 jours après inoculation du milieu par <i>L. plantarum</i> à DO=0.01 et en transférant les mouches dans des tubes neufs matins et soirs.	79
4.10	L'épithélium intestinal de la drosophile	81
4.11	Les activités immunitaires au niveau de l'épithélium intestinal	82
4.12	Activation des Cellules Souches Intestinales	82

4.13	Un outil génétique pour visualiser les cellules souches intestinales et les entéroblastes	83
4.14	Proportion d'individus présentant une activation de leur cellules souches intestinales en réponse à divers stress.	84
4.15	Nombre, acircularité et taille des déjections des drosophiles en présence ou absence de flore intestinale.	92
4.16	Densités de distribution des valeurs de couleur et de luminance des déjections des drosophiles en présence ou absence de flore intestinale.	93
4.17	Nombre, acircularité et taille des déjections des drosophiles en présence ou absence d'infection intestinale.	94
4.18	Densités de distribution des valeurs de couleur et de luminance des déjections des drosophiles en présence ou absence d'infection intestinale.	95
4.19	Capacité de contenance de nourriture des individus sauvages et mutants, en présence ou en absence de flore.	96
4.20	Consommation alimentaire des individus axéniques sauvages et mutants.	96
4.21	Nombre de gènes dérégulés dans la mouche entière, l'intestin, et les deux tissus. .	99
6.1	Carte du vecteur PGEM-T Easy de <i>Promega</i>	120
6.2	Présentation du dispositif expérimental d'analyse de la physiologie intestinale de la drosophile	134
6.3	Présentation du système colorimétrique TSL	135
6.4	Impact du genre et du régime alimentaire sur la distribution des valeurs de luminance des déjections de drosophiles.	136
6.5	Charges bactériennes des drosophiles à la fin de l'analyse de leur physiologie intestinale en présence ou absence de flore.	137
6.6	Charges bactériennes des drosophiles à la fin de l'analyse de leur physiologie intestinale en présence ou absence d'infection.	138
6.7	Liste des gènes cibles de Relish prédites par CisTargetX	207
6.8	Liste des gènes cibles de GATAe prédites par CisTargetX	208
6.9	Liste des gènes cibles de Mad prédites par CisTargetX	209

Liste des tableaux

1.1	Historique des découvertes majeures en immunologie et des attributions du prix Nobel de physiologie et médecine	5
1.2	Les familles de peptides antimicrobiens chez la drosophile.	9
3.1	Résultats du crible génétique mené pour identifier les gènes dont l'expression est requise dans les hémocytes pour assurer la survie aux infections systémiques par <i>Staphylococcus aureus</i> ou <i>Salmonella typhimurium</i>	52
3.2	Détails des différentes recettes utilisées dans les études de l'impact de la présence de microorganismes dans l'environnement de la drosophile sur sa longévité. . . .	60
4.1	Liste des genres bactériens détectés dans l'eau.	64
4.2	Tableau récapitulatif des espèces identifiées dans les banques de clones 16S. . . .	65
4.3	Tableau récapitulatif des clones non identifiés dans les banques de clones 16S. . .	66
4.4	Estimations du nombre total d'espèces présentes dans les population microbiennes analysées.	66
4.5	Caractéristiques des listes de gènes qui répondent à un seul facteur.	99
4.6	Caractéristiques des listes de gènes communs aux facteurs Flore et Génotype qui répondent de la même façon aux deux facteurs.	100
4.7	Caractéristiques des listes de gènes communs aux facteurs Flore et Génotype qui répondent de façon opposée aux deux facteurs.	101
4.8	Récapitulatif des données issues de l'analyse globale des listes de gènes dérégulés.	102
4.9	Les 10% de gènes les plus dérégulés par la présence de la flore ou par la mutation <i>pims^{Ey}</i>	105
4.10	Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la flore dans la mouche entière.	106
4.11	Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la flore dans l'intestin.	107
4.12	Validation par Q-PCR de la liste de gènes réprimés en présence de la flore dans l'intestin.	108
4.13	Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la mutation <i>pims^{Ey}</i> dans l'intestin.	109
4.14	Validation par Q-PCR de la liste de gènes réprimés en présence de la mutation <i>pims^{Ey}</i> dans l'intestin.	110
4.15	Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la mutation <i>pims^{Ey}</i> dans la mouche entière.	110
4.16	Validation par Q-PCR de la liste de gènes réprimés en présence de la mutation <i>pims^{Ey}</i> dans la mouche entière.	111

6.1	Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur.	152
6.2	Correspondance Nom - Numéro dans la liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur	154
6.3	Liste des gènes induits par la présence de la flore	161
6.4	Liste des gènes réprimés par la présence de la flore	172
6.5	Liste des gènes induits par la mutation $pims^{Ey}$	180
6.6	Liste des gènes réprimés par la mutation $pims^{Ey}$	192
6.7	Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont induits en présence de la flore bactérienne.	193
6.8	Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont induits par la mutation $pims^{Ey}$	194
6.9	Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont réprimés par la mutation $pims^{Ey}$	194
6.10	Liste des gènes induits en mouche entière par la présence de la flore et par la mutation $pims^{Ey}$	196
6.11	Liste des gènes induits dans l'intestin par la présence de la flore et par la mutation $pims^{Ey}$	198
6.12	Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont induits en présence de la flore ou par la mutation $pims^{Ey}$	199
6.13	Liste des gènes qui sont réprimés en mouches entières en présence de la flore ou de la mutation $pims^{Ey}$	199
6.14	Liste des gènes qui sont réprimés dans l'intestin en présence de la flore ou de la mutation $pims^{Ey}$	200
6.15	Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation $pims^{Ey}$ dans la mouche entière	202
6.16	Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation $pims^{Ey}$ dans l'intestin	204
6.17	Liste des gènes réprimés par la présence de la flore et induits par la mutation $pims^{Ey}$ dans l'intestin.	205
6.18	Résultats issus de l'analyse DAVID	206

Chapitre 1

Introduction

1.1 Préambule

D'un point de vue biologique, le but de la vie pour un organisme quelconque consiste à assurer son développement jusqu'au stade où il sera en mesure de se reproduire afin d'assurer le maintien de son espèce. Le terme anglais "*fitness*", qu'on pourrait traduire en français par "capacité physique", "forme physique" ou plus largement "santé" est couramment utilisé dans le domaine des Sciences de la Vie pour indiquer le potentiel effectif d'un individu à assurer les fonctions biologiques essentielles à sa survie et sa reproduction dans un environnement donné. Le maintien de l'équilibre des systèmes à l'intérieur de l'organisme pour assurer le bon fonctionnement de celui-ci en dépit de l'évolution des conditions environnementales est nécessaire, et le terme "homéostasie" sert habituellement à désigner ce phénomène.

Dans la nature, de nombreuses formes de vie différentes partagent un environnement commun. Certaines sont multicellulaires, d'autres sont unicellulaires. Ces différents êtres vivants entrent en contact les uns avec les autres, et il se produit nécessairement des interactions entre eux. Ces interactions peuvent être neutres et sans effet sur l'homéostasie des organismes, ou au contraire la perturber de façon importante, allant jusqu'à réduire la *fitness* de l'une ou l'autre des parties. On distingue donc plusieurs types d'interactions entre les organismes vivants, en particulier dans le cas d'un organisme multicellulaire et des êtres vivants unicellulaires.

1.2 Les interactions hôtes - microorganismes

Tous les organismes vivants possèdent des barrières qui définissent la limite entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'organisme. Des interactions entre un organisme multicellulaire, qu'on qualifiera d' "hôte" et des formes de vie unicellulaires se produisent inévitablement au niveau des surfaces de l'hôte qui sont exposées à l'environnement extérieur. Dans le cas des animaux, la peau et les muqueuses sont concernées. Les différents types d'interactions qui peuvent se produire entre les deux parties peuvent être caractérisées selon plusieurs paramètres : la localisation du microbe (soit à l'intérieur de l'organisme hôte, soit à l'extérieur), l'impact sur la *fitness* de l'hôte (positif ou négatif), et la persistance dans le temps du microorganisme.

Les cellules étrangères à l'hôte ne sont pas supposées se trouver à l'intérieur de l'organisme. Lorsque ce phénomène se produit, on parle d'infection. En général, cette situation perturbe l'équilibre biologique de l'hôte, et deux cas de figures sont envisageables par ce dernier pour y répondre. Il peut attaquer l'agent perturbateur dans le but d'éradiquer sa présence et tenter de

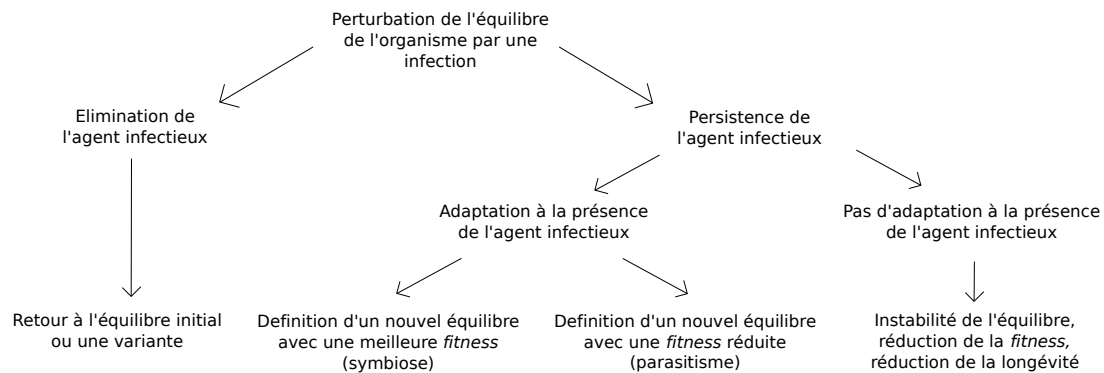


FIGURE 1.1 – Les voies d'évolution possibles d'une infection

Un exemple

retourner à l'état initial de son équilibre, ou un état proche s'il lui reste des séquelles de cet évènement. Alternativement, si l'agent étranger persiste et demeure à long terme à l'intérieur de son organisme, l'hôte peut chercher à s'adapter aux nouvelles conditions de vie qui sont les siennes en définissant un nouvel état d'équilibre. Si ce nouvel état débouche sur une *fitness* réduite par rapport à sa condition précédente, on parle de parasitisme ; dans le cas contraire, on parle de symbiose. Lorsque l'hôte ne parvient ni à éliminer l'agent perturbateur de son équilibre ni à s'adapter à sa présence, il subit généralement une forte réduction de sa *fitness*, plus ou moins rapide, qui peut causer ultimement l'arrêt du fonctionnement de l'organisme et la mort de l'individu. La figure 1.1, page 2 résume ces différentes possibilités d'évolution d'une situation d'infection. Par ailleurs, il est des microorganismes contre lesquels l'hôte déclenche une réaction dès qu'ils sont détectés, même si ils n'ont pas traversé les barrières de l'hôte.

Si les microorganismes de l'environnement demeurent à l'extérieur de l'organisme hôte, on parle généralement de commensalisme. Le mot "commensalisme" désigne le partage des ressources environnementales, c'est à dire le fait de se nourrir de la même nourriture. Les microbes présents dans l'appareil digestif des animaux sont donc des commensaux de leur hôte, car ils se nourrissent de ce dont l'hôte se nourrit.

Il faut noter que les relations hôte - microbes ne sont généralement pas figées dans un état particulier, mais évoluent constamment, influencées par les conditions environnementales. Elles peuvent ainsi être neutres dans certaines circonstances, et influentes dans d'autres. Par exemple, la bactérie *Wolbachia* exerce un contrôle sur la biologie reproductive de la drosophile, de sorte que la proportion d'individus infectés au sein d'une population augmente de génération en génération. En parallèle, elle confère à son hôte une meilleure résistance à diverses infections virales [98, 225].

1.3 Un système de défense contre les infections

Les animaux sont équipés d'un système dit immunitaire, capable de réagir à la détection de signaux perçus comme annonçant un danger pour maintenir l'intégrité de l'organisme. Son rôle est de protéger l'organisme contre les dommages liés aux multiples stress qu'il peut subir et qui provoquent une rupture de l'homéostasie, en cherchant à éliminer ce qui cause le déséquilibre. Il intervient notamment en réponse aux infections microbiennes. En effet, ce système possède une série de molécules qui servent à détecter la présence des microorganismes, et lorsque c'est nécessaire, provoque une série d'évènements cellulaires et moléculaires dont le but est de détruire

ces cellules étrangères. Il existe sous une forme dite innée chez tous les animaux, qui est codée par le génome de manière à être directement opérationnelle, à laquelle s'ajoute une forme adaptative chez les vertébrés. Le système immunitaire inné est directement responsable de la détection des microorganismes, et c'est son activation qui déclenche le système adaptatif chez les vertébrés. Ce dernier est caractérisé par le fait qu'il repose sur un remaniement somatique du génome dans les cellules impliquées, et n'est par conséquent pas transmis par un individu à sa descendance, et par le fait qu'il dispose d'une capacité de mémoire qui lui permet d'être plus rapide à réagir lors d'une deuxième rencontre avec un agent infectieux.

La détection des microorganismes par le système immunitaire inné des animaux ne déclenche pas systématiquement une réaction agressive à l'encontre des microbes. En effet, la présence de ces populations cellulaires étrangères est tolérée dans une certaine mesure au niveau des zones de contact avec l'environnement extérieur, en particulier les muqueuses. L'appareil digestif des animaux est une structure qui contient habituellement des grandes quantités de microorganismes. Chez l'homme, plusieurs centaines d'espèces différentes ont été recensées, pour un nombre total de cellules 10 fois supérieur au nombre de cellules qui composent le corps humain. Or, cette présence microbienne n'est pas forcément synonyme de danger, mais apporte au contraire des activités biologiques à son hôte qui participent à la digestion de ses aliments [83, 230, 249].

1.4 Aspect historique de la recherche en immunologie

Les progrès en médecine et le développement de l'hygiène ont permis l'allongement de l'espérance de vie tout au long du 20e siècle. Cependant, l'Organisation Mondiale de la Santé a rapporté en 1999 que plus de 25% des décès recensés à l'échelle mondiale au cours de l'année 1998 étaient dus à des maladies infectieuses, soit la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires, et environ le double des cancers. Il est évident que les activités de recherche fondamentale et médicale sont essentielles pour tenter de réduire ces chiffres.

TABLE 1.1 – Historique des découvertes majeures en Immunologie

Date	Auteur(s)	Contribution
430bc	Thucydide	Thucydide note pendant l'épidémie de fièvre jaune qui touche Athènes que seules les personnes ayant préalablement survécu à l'infection peuvent s'approcher des malades pour s'en occuper.
1400's	Chine	Variolisation : les chinois prélevaient du pus d'un individu faiblement atteint de la variole et l'inoculaient chez un individu sain. L'individu variolisé avait une meilleure probabilité de résister à une éventuelle variole grave par la suite. Introduite en Angleterre vers 1720, puis dans toute l'Europe. Le risque de développer une véritable variole existe, et une petite proportion des individus variolisés volontairement en mourrait.
1796	Edward Jenner	Le médecin de campagne anglais Edward Jenner avait remarqué que les fermières en contact régulier avec les vaches porteuses de la vaccine, une forme bovine de la variole inoffensive pour l'homme, n'étaient pas atteintes par les épidémies de varioles, fréquentes à cette époque. Le 14 mai 1796, il préleva du pus d'une personne contaminée par la vaccine et l'injecta à un jeune garçon. Après que le garçon eut été guéri de la maladie bénigne induite par cette injection, il lui administra une forme virulente de la variole. Le garçon surmonta l'infection avec des symptômes légers. Le virus de la vaccine est à l'origine du terme "vaccination".
1882	Robert Koch	*Découverte du bacille responsable de la tuberculose (PN 1905).
1880's	Ilya Ilyich Mechnikov	*Découverte de la phagocytose dans l'étoile de mer (PN 1908 avec Paul Ehrlich)
1885	Louis Pasteur	Développement d'un vaccin antirabique.

Continue sur la page suivante

TABLE 1.1 – suite de la page précédente

Date	Auteur(s)	Contribution
1890	Emil von Behring	*Découverte de l'existence d'une antitoxine contre la toxine diphtérique dans le sérum d'individus ayant survécu à la diphtérie, et l'utilisation de ces anti-sérum dans le traitement de la maladie (PN1901).
1894	Emil von Behring, Paul Ehrlich	*Développement d'un traitement anti diphtérique. (PN Paul Ehrlich 1905 avec Ilya Ilyich Mechnikov)
1898	Jules Bordet	*Découverte du complément (initialement nommé alexine) (PN1919)
1898	Ernest Duchesne	Découverte de l'action antibactérienne de certains champignons.
1900	Karl Landsteiner	*Découverte des groupes sanguins (PN1930).
1902	Charles Richet	*Découverte de l'allergie (anaphylaxie) (PN1913).
1909	Charles Jules Henri Nicolle	*Découverte du pou comme vecteur du Typhus et mise en place de règles d'hygiène qui réduisent fortement son occurrence. (PN19028)
1917	Julius Wagner-Jauregg	*Traitement de la syphilis par induction de la fièvre (injection du parasite du paludisme) (PN1927)
1922	Alexander Fleming	Découverte des lysozymes
1928	Alexander Fleming	*Découverte de la pénicilline. (PN 1945 avec Ernst Boris Chain, Howard Walter Florey)
1937	Max Theiler	*Développement d'un vaccin contre la fièvre jaune (PN 1951)
1943	Selman Abraham Waksman	*Découverte de la streptomycine, premier antibiotique efficace dans le traitement de la tuberculose (PN 1952)
1948	Astrid Fagraeus	Découverte des Lymphocytes B comme producteurs des anticorps
1949	John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller, Frederick Chapman Robbins	*Mise au point de techniques pour l'isolation et la culture du virus de la poliomyélite (PN 1954)
1950's	Frank Macfarlane Burnet, Peter Brian Medawar	*Description du phénomène de tolérance immunitaire (contraire de l'anaphylaxie) (PN1960)
1957	Frank Macfarlane Burnet	Description du mécanisme de sélection clonale des Lymphocytes T
1957	Alick Isaacs, Jean Lindemann	Découverte de la résistance antivirale médiée par les interférons
1959	Joseph E. Murray, E. Donnall Thomas	*Première transplantation d'organe (rein). Travaux sur l'immunosuppression. (PN 1990)
1960's	Jacques Miller	Description des populations de Lymphocytes T et B. Fin de la mise en concurrence de l'immunité Humorale et de l'immunité cellulaire.
1959-1961	Gerald M. Edelman, Rodney R. Porter	*Caractérisation de la structure des anticorps (PN 1972)
1963	Jean Dausset	*Découverte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (PN 1980 avec Baruj Benacerraf, George D. Snell)
1963's	Baruch S. Blumberg, D. Carleton Gajdusek	*Etudes sur la dissémination des maladies infectieuses (PN 1976)
1970's	Stanley Cohen	Découvertes et description des cytokines
1973	Ralph Steinman	*Découverte des cellules dendritiques (PN 2011 avec Bruce A. Beutler, Jules Hoffmann)
1974	Peter C. Doherty, Rolf M. Zinkernagel	*Découverte de la présentation des antigènes par les molécules du CMH (PN 1996)
1975	Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler, César Milstein	*Production d'anticorps monoclonaux (PN 1984)
1983	Harald zur Hausen, Françoise Barré-Sinoussi, Luc Montagnier	*Découverte du Virus de l'Immunodéficience Humaine (PN 2008)
1985	Susumu Tonegawa	*Identification des gènes codant les anticorps (PN 1987)
1985	Barry J. Marshall, J. Robin Warren	*Implication de la bactérie <i>Helicobacter pylori</i> dans le développement d'ulcères gastriques (PN 2005)
1989	Charles Janeway	Concept de reconnaissance de molécules d'origine microbienne par des récepteurs de l'hôte codé dans le génome et qui ne sont pas réarrangés comme les anticorps : les "Pattern Recognition Receptor".
1994	Polly Celine Eveline Matzinger	"Théorie du danger" : le système immunitaire n'est pas activé sur la base de la reconnaissance du Soi et du Non Soi, mais sur la détection de signaux perçus comme annonçant un danger.

Continue sur la page suivante

TABLE 1.1 – suite de la page précédente

Date	Auteur(s)	Contribution
1996	Jules A. Hoffmann	*Découverte du rôle du récepteur Toll dans l'activation de l'immunité innée (PN 2011 avec Bruce A. Beutler, Ralph Steinman)
1998	Bruce A. Beutler	*Démonstration génétique du rôle d'un récepteur de type Toll (TLR4) dans l'activation de l'immunité innée chez la souris (PN 2011 avec Jules Hoffmann, Ralph Steinman)

TABLE 1.1 – Historique des découvertes majeures en immunologie et des attributions du prix Nobel de physiologie et médecine. L'astérisque (*) devant la description d'une contribution signale qu'elle a valu le prix Nobel de Physiologie et Médecine à ses auteurs à l'année indiquée entre parenthèses.

1.5 Un modèle d'étude : l'insecte *Drosophila melanogaster*

La drosophile est un insecte utilisé comme modèle d'étude en biologie depuis plus d'un siècle. Son cycle de vie rapide (voir figure 1.2, page 5), l'aspect peu onéreux de son entretien (voir la section 2.1 du chapitre Matériel et Méthodes, page 22), et le nombre important d'individus issus de chaque accouplement en ont fait un modèle de choix pour mener des études génétiques. Son génome a été séquencé en 2000 [2, 162] et de nombreux outils existent pour manipuler l'expression de ses gènes de manière contrôlée au niveaux spatial et temporel. Dans la nature, elle se nourrit et se développe sur des fruits en décomposition, et de ce fait est habituée à un contact étroit avec des microorganismes. L'étude de son système immunitaire a conduit à des découvertes majeures chez les mammifères, dont celle des TLR [134, 184, 236], pour laquelle Jules Hoffmann, Bruce Beutler et Ralph Steinman ont été récompensés par le prix Nobel de physiologie et médecine en 2011.

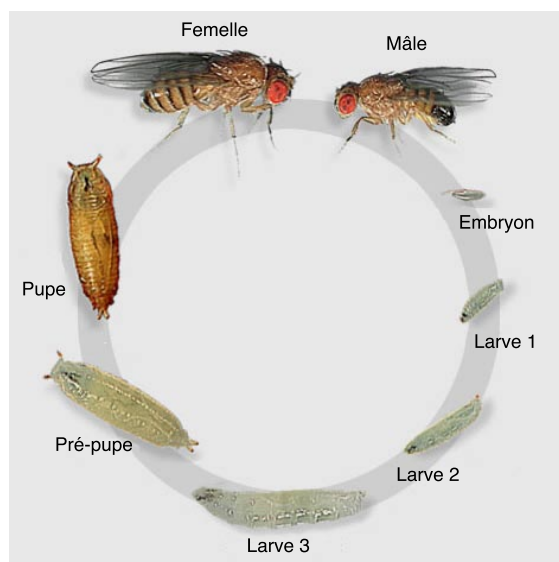


FIGURE 1.2 – Le cycle de vie de la drosophile. La forme développementale et la forme adulte ne sont pas les mêmes, et la transition de l'une à l'autre repose sur une étape de métamorphose. Le développement embryonnaire est suivi de 3 cycles larvaires, qui sont des phases de croissance. La transition entre eux se fait par une mue. Lorsque la larve du troisième stade atteint un niveau de croissance suffisant, elle forme une pupa, à l'intérieur de laquelle les structures larvaires sont dégradées et les structures adultes se développent : c'est la métamorphose. Les tissus adultes sont formés à partir de cellules regroupées dans ce qu'on appelle les disques imaginaux. L'adulte peut assurer les fonctions de reproduction environ 16 heures après son émergence. Le développement à 25°C dans un environnement nutritif non limitant dure entre 9 et 10 jours. Figure tirée du site Internet FlyMove (<http://flymove.uni-muenster.de/>)

1.6 Le système immunitaire de la drosophile

1.6.1 Des barrières physiques limitent les contacts entre les cellules de la drosophile et les particules de l'environnement

La drosophile possède des barrières physiques qui limitent les contacts entre ses tissus et les particules étrangères de l'environnement (Figure 1.3, page 7). L'épiderme est recouvert de cuticule, les voies respiratoires de taenidia et l'appareil digestif d'une membrane péritrophique. Ces matrices sont composées de chitine, protéoglycanes et glycoprotéines [85, 99, 153].

La cuticule est un exosquelette rigide qui recouvre tout le corps de l'animal ainsi que les régions les plus antérieures et postérieures du tube digestif et l'extrémité des trachées. Sa fonction primaire est de retenir l'eau à l'intérieur de l'organisme et les substances exogènes à l'extérieur. Les trachées, qui permettent le transport de l'oxygène, sont recouvertes d'une membrane chitineuse appelée taenidia. Cette membrane limite les interactions avec le milieu extérieur tout en permettant les échanges gazeux. La membrane péritrophique est une barrière physique acellulaire et semi-perméable qui délimite deux espaces, l'espace endo-péritrophique (la lumière intestinale) et l'espace ectopéritrophique (entre la membrane et l'épithélium) (Figure 1.3d, page 7). Cette matrice est continuellement synthétisée par les cellules de l'intestin antérieur et forme un tube continu le long du tractus digestif. Elle joue un rôle similaire au mucus de l'appareil digestif des vertébrés : elle protège l'épithélium intestinal du bol alimentaire et des enzymes digestives, elle empêche les microorganismes situés dans la lumière intestinale d'interagir directement avec les cellules épithéliales, et constitue également une barrière biochimique qui séquestre et parfois inactive les toxines ingérées. Une corrélation a été observée entre le degré de contamination de la nourriture par des microorganismes et la présence de cette membrane péritrophique chez certains insectes [133]. Ainsi les insectes se nourrissant sur des milieux peu contaminés (sang des vertébrés, nectar de fruits ou hémolymphe d'autres insectes) ne présentent généralement pas de membrane péritrophique tandis que ceux qui se nourrissent de fruits en décomposition riches en microorganismes, comme la drosophile, en possèdent habituellement une.

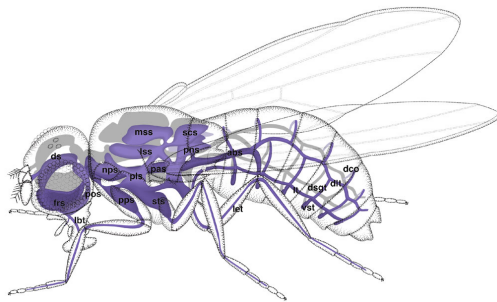
1.6.2 Des barrières biochimiques protègent les surfaces épithéliales

1.6.2.1 Une zone acide dans l'intestin moyen

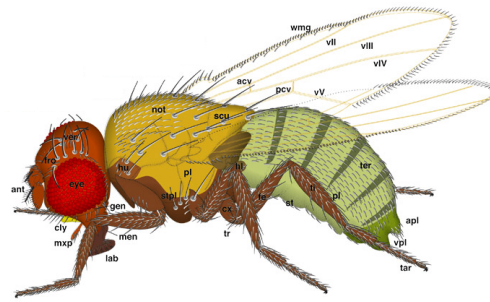
L'intestin est constitué d'une seule couche de cellules épithéliales, soutenue par une lame basale et des muscles viscéraux. Les intestins moyens de la larve et de l'adulte possèdent une région où l'acidité est importante ($\text{pH} \leq 3$) à cause de la présence des cellules de copper [68] (Figure 1.4, page 8). Ces cellules permettent la translocation de protons et d'ions chlore, conduisant à la formation d'acide chlorhydrique HCl. Cette acidité constitue une protection naturelle contre les pathogènes et favorise la digestion. En revanche, les parties antérieures et postérieures de l'intestin moyen présentent un pH basique [203].

1.6.2.2 Un équipement protéolytique dirigé contre les molécules bactériennes

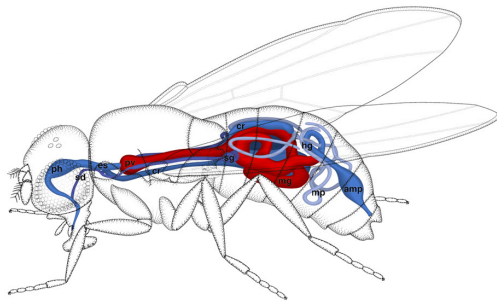
La drosophile produit dans son intestin moyen des amidases, qui fixent et éventuellement dégradent le peptidoglycane, un composant de la paroi des bactéries [24, 250]. Elle produit également des lysozymes, des protéines conservées qui possèdent une activité bactéricide. Constitutivement exprimées dans l'intestin, elles digèrent la chaîne osidique du peptidoglycane des enveloppes bactériennes *in vitro* et participeraient ainsi aux mécanismes intestinaux de défense de la drosophile [107]. Un groupe de sept gènes codant des lysozymes a initialement été identifié



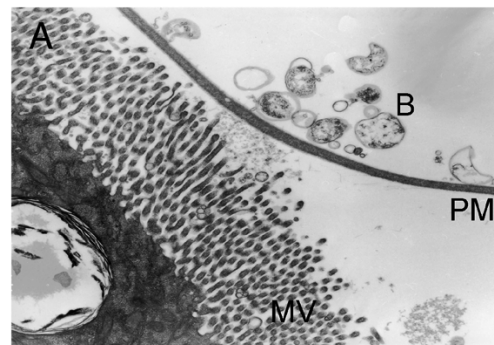
(a) Les voies respiratoires



(b) L'exosquelette



(c) Le tube digestif



(d) Membrane péritrophique de l'intestin

FIGURE 1.3 – Les barrières physiques de la drosophiles adulte

Les voies respiratoires (a), l'exosquelette (b), le tube digestif (c) et la membrane péritrophique de l'intestin chez la drosophile adulte (d). (b) Tête (rouge), thorax (jaune), abdomen (vert). Les 3 paires de pattes (marron) et la paire d'ailes sont sur le thorax. (c) La portion rouge du tube digestif correspond à l'intestin moyen (voir Figure 1.4, page 8). (d) Le milieu extérieur (B) est séparé de l'intérieur (A) par la membrane péritrophique (PM). Les microvilosités de la face apicale des cellules de l'épithélium sont visibles (MV). Les schémas (a, b, c) sont tirés de l' "Atlas of Drosophila Development" de Volker Hartenstein (<http://www.sdbonline.org/fly/atlas/00contents.htm>); (d) est une image prise en microscopie électronique par Khush et al. [121].

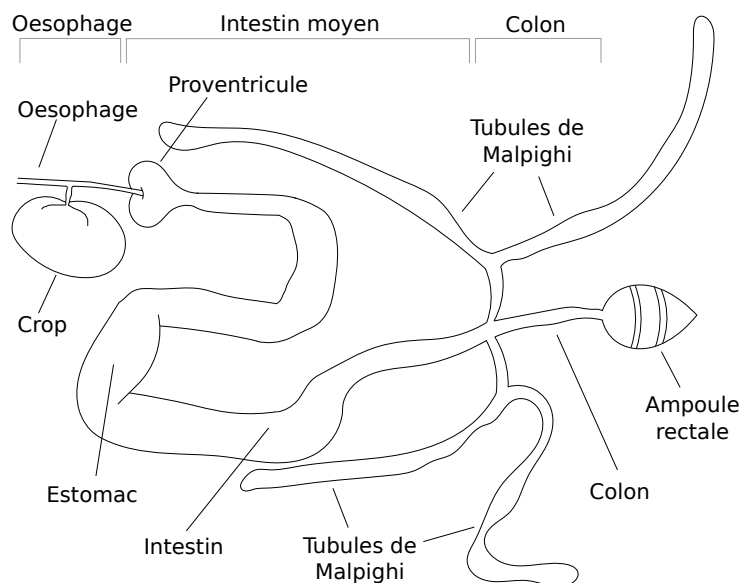


FIGURE 1.4 – Schéma du tube digestif adulte de la drosophile.

Le crop est un organe de stockage de la nourriture, relié à l'oesophage, en amont de l'intestin moyen. L'intestin moyen commence avec le proventricule et se termine au niveau de la jonction avec les tubules de Malpighi. Le proventricule sécrète les protéines constitutrices de la membrane péritrophique. Une zone acide, composée des cellules de copper et située entre 2 repliements du tube digestif, correspond à l'estomac. Les tubules de Malpighi sont les homologues fonctionnels des reins chez les mammifères et servent à détoxifier l'hémolymph des métabolites qu'elle contient. Ils sont connectés au tube digestif au niveau de la jonction entre l'intestin moyen et le colon. Le tube digestif se termine par l'ampoule rectale, qui permet le relargage des déchets à l'extérieur.

[64], mais le séquençage et l'annotation de son génome ont mis en évidence la présence de six autres gènes codant des lysozymes [121].

1.6.2.3 Les espèces réactives de l'oxygène

La synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'intestin constitue un moyen supplémentaire de contrôler la colonisation microbienne de la lumière intestinale (Figure 4.11, page 82). La présence des microorganismes y induit la production de ces molécules toxiques, qui est entièrement dépendante de l'activité de la protéine Dual Oxidase [92, 93]. L'absence de cette enzyme dans l'intestin provoque une réduction de l'espérance de vie de la drosophile due à une surprolifération de la flore intestinale. La production de ROS est également essentielle à la survie après l'ingestion de grandes quantités de la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15 [94] : en absence de l'enzyme Dual Oxidase, les ROS ne sont pas produits, les bactéries ingérées prolifèrent et la drosophile meurt rapidement. Cependant, la production excessive de ROS est délétère pour l'hôte, et leur détoxification est vitale à sa survie. L'enzyme qui assure cette fonction est l' "Im-mune Responsive Catalase" (IRC). Son inactivation entraîne une production excessive de ROS et la mort de la drosophile après une ingestion massive de bactéries [94]. Pris dans leur ensemble, ces données soulignent la nécessité d'un équilibre entre l'activité de l'oxydase et de la catalase afin de contrôler la prolifération bactérienne sans induire de dommages à l'hôte.

1.6.2.4 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des courtes chaînes peptidiques cationiques et amphiphiles largement conservées, qui interviennent dans les mécanismes de défense immunitaire aussi bien chez les végétaux que chez les animaux [37]. La drosophile possède une vingtaine de ces peptides, regroupés en 7 familles (Table 1.2, page 9) [36, 149]. Ils possèdent un large spectre d'action, mais chacun d'entre eux possède une certaine spécificité antimicrobienne. Le mode d'action de ces peptides n'est pas encore complètement élucidé, mais ils sont multiples [37]. Il semble que certains peuvent induire la formation de pores dans la paroi bactérienne, et provoquent ainsi la lyse de la cellule.

Une expression constitutive de ces peptides est mise en place dans les épithélia, mais elle peut être induite à des taux très élevés par la détection des microbes (voir plus loin) [76, 232]. Par exemple, la Drosomycine est produite constitutivement dans les glandes salivaires et dans la spermathèque des femelles, et la Cécropine dans le conduit éjaculatoire des mâles [195, 202]. Cette synthèse constitutive n'est pas régulée par les voies de signalisation de type NF- κ B classiques mais par des facteurs de transcription spécifiques des tissus. Les facteurs de transcription de type GATA [202], le facteur Caudal [96, 195, 194], et ceux de la famille POU [115, 233] sont impliqués.

Certains microorganismes sont très immunogènes, c'est à dire qu'ils déclenchent une réponse immunitaire importante dès que leur présence est détectée, même en absence d'infection. C'est le cas de la bactérie *Erwinia carotovora carotovora 15*, qui n'est pas pathogène pour la drosophile, mais sa présence dans l'intestin suffit pour induire la production de peptides antimicrobiens au niveaux local et systémique chez la larve, et localement chez l'adulte.

Familles	Gènes	Taille (kDa)	Conc. (μ M)	Induction	Pic (h)	Régulation	
						Const.	Induite
Attacine	4	20	nd	Bact. Gram (-)	6		TD, CG, ARM
Diptéricine	2	9	0.5	Bact. Gram (-)	6-12		TD, CG, TM
Drosocine	1	2.5	40	Bact. Gram (-/+)	12-48	ARF	TD, CG, SR
Défensine	1	4	1	Bact. Gram (+)	12	ARF	E, CG, GL
Cécropine	4	4	20	Bact. Gram (-), Champignons	6	AR	TD, CG, TM
Drosomycine	7	5	100	Champignons	48	ARF, GS	SR, CG
Metchnikowine	1	3	10	Champignons	24-48	TD	TD, CG, TM, GL

TABLE 1.2 – Les familles de peptides antimicrobiens chez la drosophile.

La colonne "Gènes" indique le nombre de gènes de la famille correspondante codés dans le génome, la colonne "Conc." indique la concentration dans l'hémolymphe après une induction par infection, en micromolaire, la colonne "Induction" indique par quel type de microorganisme est déclenchée la synthèse, la colonne "Pic" indique le temps qu'il faut (en heures) pour que l'expression transcriptionnelle du gène soit maximale, et la double colonne "Régulation" indique le type de régulation (constitutive - "Const." - ou induite) selon les tissus : TD : Tube Digestif, CG : Corps Gras, ARM : Appareil Reproducteur Mâle, TM : Tubules de Malpighi, AR : Appareil Reproducteur, ARF : Appareil Reproducteur Femelle, SR : Système Respiratoire, E : Epithelia, GL : Glandes labellaires, GS : Glandes Salivaires. "nd" : non déterminé. D'après [36, 135, 193, 231, 233, 238]

1.6.2.5 Des partenaires étrangers

La présence d'une flore commensale établie à l'intérieur du tube digestif de la drosophile peut constituer une barrière biologique protectrice contre la colonisation et l'expansion de souches potentiellement pathogènes. Ce principe a été démontré par les travaux de Ryu et al. [194], qui rapportent que dans leurs stocks de drosophiles une espèce bactérienne commensale inhibe

la croissance d'une autre espèce potentiellement pathogène, et par conséquent la présence dans l'intestin de l'espèce commensale a un impact direct sur la santé de l'animal.

1.6.3 La réponse cellulaire

1.6.3.1 Les hémocytes, cellules circulantes de la drosophile

Des cellules immunitaires circulantes proches de la lignée myéloïde des vertébrés, les hémocytes, sont activées lors d'une infection. L'hématopoïèse se déroule en deux étapes chez la drosophile [102] (Figure 1.5, page 11). Une première population d'hémocytes se différencie au stade embryonnaire sous le contrôle de facteurs de transcription similaires aux facteurs impliqués dans l'hématopoïèse des mammifères, tels que ceux des familles GATA, FOG et Runx. Une seconde différenciation a lieu au stade larvaire dans un organe hématopoïétique spécialisé, la glande de la lymphe. Les voies de signalisation JAK/STAT, Toll, Hedgehog et Notch sont impliquées dans la prolifération et la différenciation de ces cellules [62]. Présents majoritairement dans l'hémolymphe, les hémocytes circulent dans l'espace extracellulaire appelé hémocoel. Dans la larve de drosophile, on distingue trois types cellulaires. Les plasmotocytes, qui représentent 95% des hémocytes, et qui sont aptes à la phagocytose [219], sont les seules cellules qui persistent jusqu'au stade adulte. Les cellules à cristaux, représentant moins de 5% des cellules hémocytaires larvaires, sont source d'enzymes pour la réaction de mélanisation [150]. Enfin les lamellocytes, qui se différencient uniquement sous certaines conditions telles que l'invasion des larves par des guêpes parasitaires, jouent un rôle dans l'encapsulation des parasites [63].

1.6.3.2 La phagocytose par les plasmotocytes

Les plasmotocytes sont responsables de la phagocytose des microorganismes, des corps apoptotiques et des particules étrangères inertes (Figure 1.6, page 12). Au cours de l'embryogenèse et de la métamorphose, les plasmotocytes sont impliqués dans l'ingestion et la digestion des cellules apoptotiques et des débris cellulaires [80]. Leur absence provoque une létalité embryonnaire importante (voir article 1, page 46). La phagocytose constitue également un élément essentiel de la réponse immunitaire. Elle permet l'élimination rapide d'une partie des microorganismes qui pénètrent dans la cavité interne de la drosophile. Ces cellules peuvent internaliser en quelques minutes une grande variété de structures comme des bactéries ou des levures contre lesquelles elles possèdent des récepteurs particuliers, mais également de petites particules étrangères abiotiques comme des billes de polystyrène [70] (Figure 1.6, page 12). Ce processus se divise en trois étapes : la reconnaissance et le ciblage du matériel à phagocyter, l'endocytose ou ingestion après réorganisation du cytosquelette, et enfin la destruction du pathogène par les enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes après fusion de ces derniers avec les vésicules de phagocytose, les phagosomes [219]. Les plasmotocytes sont des intervenants essentiels pour la résistance à certaines infections bactériennes (Article 1 et [44]). Ils sont les premiers effecteurs inductibles qui agissent lors de la réponse immunitaire, bien avant la production des peptides antimicrobiens.

1.6.3.3 L'encapsulation par les lamellocytes

Lorsqu'un corps étranger est trop large pour être phagocyté, une autre réaction cellulaire se met en place : l'encapsulation par les lamellocytes (Figure 1.7, page 14). Ce phénomène conduit à l'accumulation de lamellocytes qui forment des couches autour du corps étranger. Il y a également recrutement de cellules à cristaux, le tout formant une capsule mélanisée qui limite le développement du parasite. A l'intérieur de cette capsule, de nombreuses réactions cytotoxiques

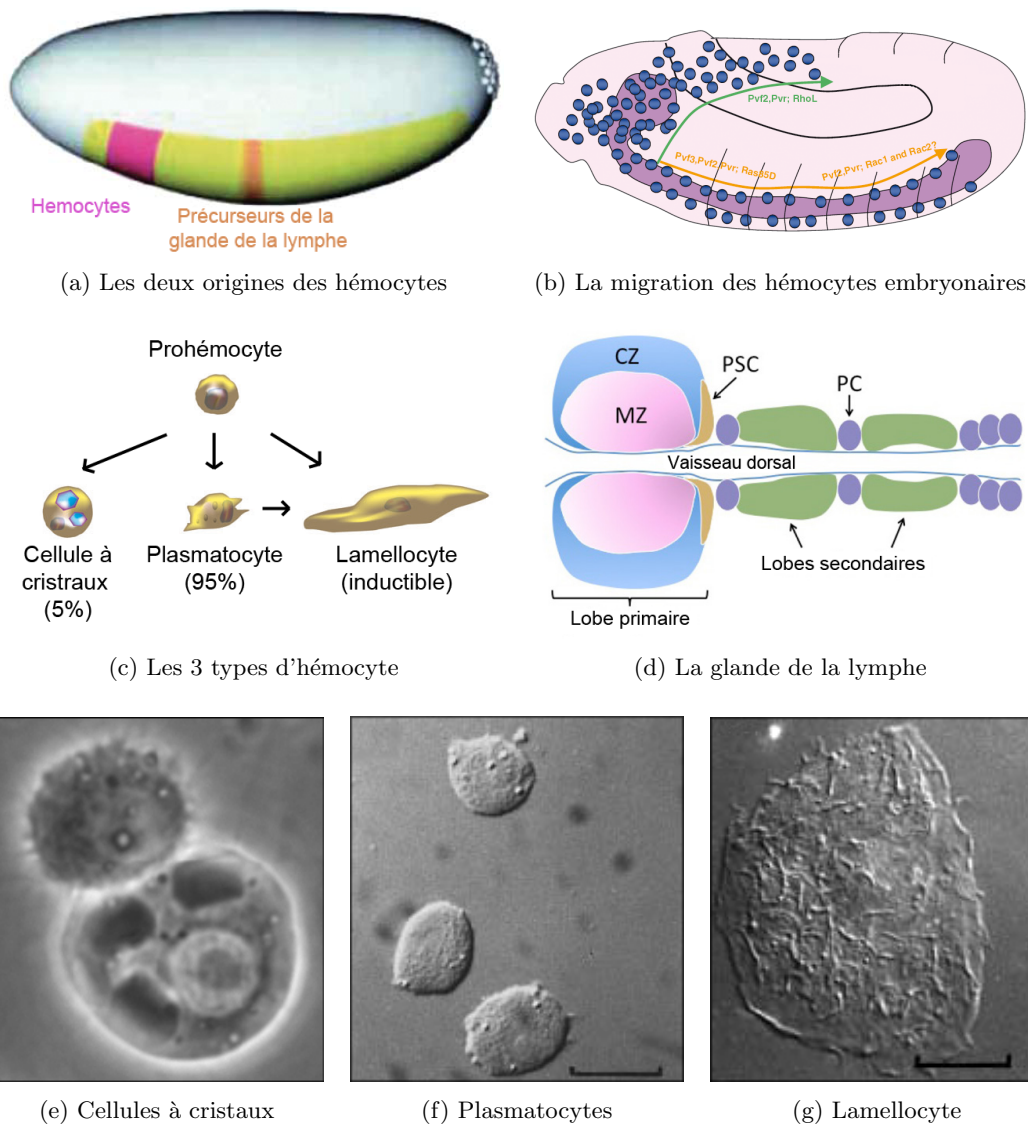
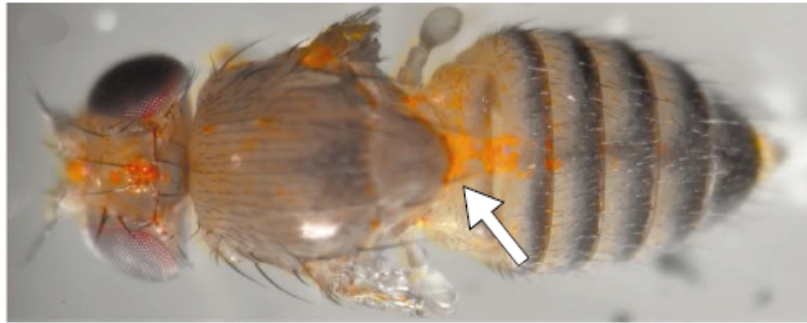
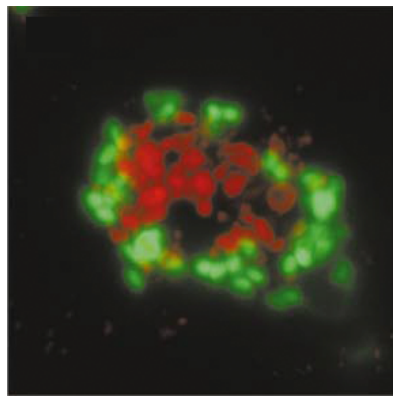


FIGURE 1.5 – Les cellules circulantes de la drosophile

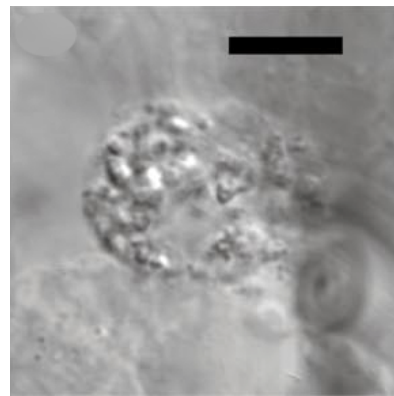
Deux vagues de production d'hémocytes ont lieu chez la drosophile : une première dans l'embryon, à partir d'une population de cellules du mésoderme (jaune) situées en antérieur (rose). La population orange constituera la glande de la lymphhe de la larve où a lieu la deuxième vague de production. (b) Les hémocytes larvaires (ronds bleus) migrent dans l'embryon, dorsalement (flèche verte) et ventralement (flèche orange) le long de la chaîne neurale (violet). Leur migration requiert notamment les gènes *pvf2*, *pvf3*, *pvr*, *rhoL*, *ras85D*. (a, b) : antérieur à gauche, dorsal en haut. (c). Il y a trois types d'hémocytes chez la larve : les cellules à cristaux (mélanisation), 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 oeuf de guêpe parasite, et peut dériver des plasmotocytes [103, 215]. Seuls les plasmotocytes sont retrouvés chez l'adulte. (d) La glande de la lymphhe est située autour du vaisseau dorsal, qui avec les cellules cardiaques et pericardiques (PC) permet la mise en circulation de l'hémolymphe. Elle est composée d'un lobe primaire, divisé en une zone médullaire (MZ) qui contient les prohémostocytes, une zone corticale (CZ) qui contient les hémocytes différenciés, et d'un centre de signalisation postérieur (PSC) qui contrôle l'hématopoïèse. L'hématopoïèse n'a normalement pas lieu dans les lobes secondaires, sauf en cas de stress immunitaire tel qu'une infestation parasitaire, auquel cas tous les types cellulaires y sont différenciés. (e-g) Des photos des trois types d'hémocytes prises en imagerie par contraste de phase. Barre d'échelle en (g, h) : 10μM. Les images sont adaptées de : (a) [102] ; (b, e) [75] ; (c) [135] ; (d) <http://www.oist.jp/fy2010-developmental-signalling-unit> ; (f, g) [129].



(a) Phagocytose de billes de polystyrène chez l'adulte



(b) Phagocytose *ex vivo* de billes de polystyrène et de bactéries



(c) Le phagocyte de l'image (b) vu en contraste de phase

FIGURE 1.6 – La phagocytose chez la drosophile

La phagocytose est effectuée par les plasmatocytes *in vivo* (a) ou *ex vivo* (b, c). (a) la flèche indique le positionnement d'une population de plasmatocytes attachés à la cuticule au niveau dorsal de l'abdomen (voir aussi l'Article 1, page 46). (b) Les plasmatocytes qui ont phagocyté des billes de polystyrènes (en rouge) sans pouvoir les dégrader ne sont pas capables de phagocyter ensuite des bactéries exprimant une protéine fluorescente (en vert). Les bactéries sont fixées sur la surface du plasmatocyte, mais sans être internalisées. (b,c) la barre d'échelle indique 10µM. Les images sont tirées de [70].

comme la mélanisation et la production de dérivés oxygénés et azotés sont déclenchées, permettant la lyse du corps étranger [165, 166, 234]. Cette réaction joue un rôle essentiel dans la réponse aux infections parasitaires. Un exemple bien étudié est l'infection de larves de drosophile par les oeufs de la guêpe parasitoïde *Leptopilina boulardi* [191, 192, 213], à laquelle la drosophile peut survivre grâce à sa réponse immunitaire (Figure 1.7, page 14).

1.6.4 Coagulation et mélanisation

Ce sont des réactions humorales immédiatement induites après la rupture de la cuticule. Elles permettent la formation d'un caillot, limitant la perte d'hémolymphe et l'infection par des microorganismes [140]. Ces réactions, activées localement au site de l'infection, sont associées à la production localisée de molécules cytotoxiques comme les réactifs oxygénés ou azotés [164].

1.6.4.1 La coagulation

La coagulation permet de limiter la perte d'hémolymphe au site de blessure et de reconstituer rapidement une seconde barrière, limitant l'entrée d'éléments exogènes dans l'organisme [135, 228]. Elle consiste en la formation d'un réseau de fibres qui constitue un gel insoluble dans lequel s'insèrent des hémocytes (Figure 1.8, page 15). Deux protéines produites par les hémocytes, Hémolectine et Fondue, participent à la formation du caillot, qui est en général renforcé par l'addition de mélanine. Cependant, aucune de ces deux protéines n'est requise pour la survie à la blessure ou l'induction d'une réponse immunitaire [21, 87, 199].

1.6.4.2 La mélanisation

La mélanisation est un mécanisme de défense restreint aux arthropodes. Elle est impliquée dans la pigmentation, l'encapsulation, mais aussi la cicatrisation des blessures [212]. La rupture de la cuticule déclenche la mélanisation qui se caractérise par une tache noire au site de blessure (Figure 1.9, page 16). Cette réaction, rapide et localisée, consiste en la synthèse *de novo* et le dépôt sur la zone blessée de mélanine, un composé qui serait toxique pour les microorganismes. La mélanine en elle-même n'a pas d'activité antimicrobienne établie, mais certains intermédiaires de la réaction protéolytique menant à sa production, comme les radicaux libres, sont toxiques pour les microorganismes [163]. Les cellules à cristaux sont impliquées dans cette réaction chez la larve. Elles servent en fait de réserve (sous forme de cristaux) de prophénoloxydases (proPO) : des oxydoréductases qui catalysent la conversion de la dopamine en mélanine. Lorsqu'elles sont activées, les cellules à cristaux lysent et libèrent dans l'hémolymphe les proPOs [150]. Une autre proPO est spécifiquement exprimée dans les lamellocytes, ce qui suggère une fonction dans la mélanisation des éléments encapsulés. On ignore encore quelle est la source précise de proPO chez l'adulte, qui est dépourvu de lamellocytes et de cellules à cristaux. Les proPO deviennent actives quand elles sont clivées par la sérine protéase "ProPO Activating Enzyme" (PPAE), elle-même régulée par une cascade de sérines protéases. Il a été montré chez d'autres arthropodes que cette cascade protéolytique est activée suite à une blessure ou à la reconnaissance d'agents pathogènes [125]. Par ailleurs, les serpinines 27A et 28D agissent comme régulateurs négatifs de la mélanisation, permettant de restreindre son activation au site de la blessure [91]. La mélanisation peut aussi être activée par la forme extracellulaire de PGRP-LE, qui fixe le peptidoglycane de type DAP sous forme monomérique ou multimérique et active l'enzyme PPAE [124].



(a) La guêpe parasitoïde *Leptopilina Boulardi*



(b) Un oeuf de guêpe encapsulé



(c) Oeuf de guêpe encapsulé dans une larve



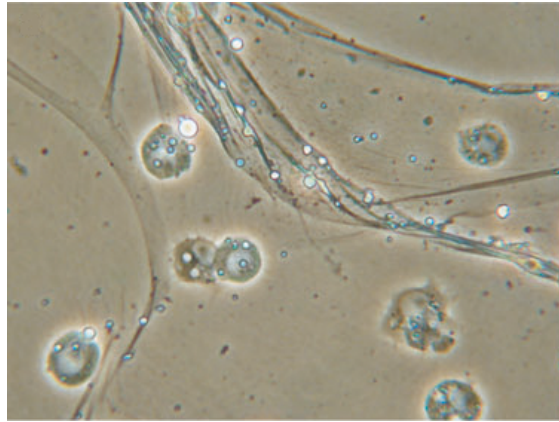
(d) Oeufs de guêpe encapsulés chez l'adulte

FIGURE 1.7 – L'encapsulation des oeufs de guêpes parasites

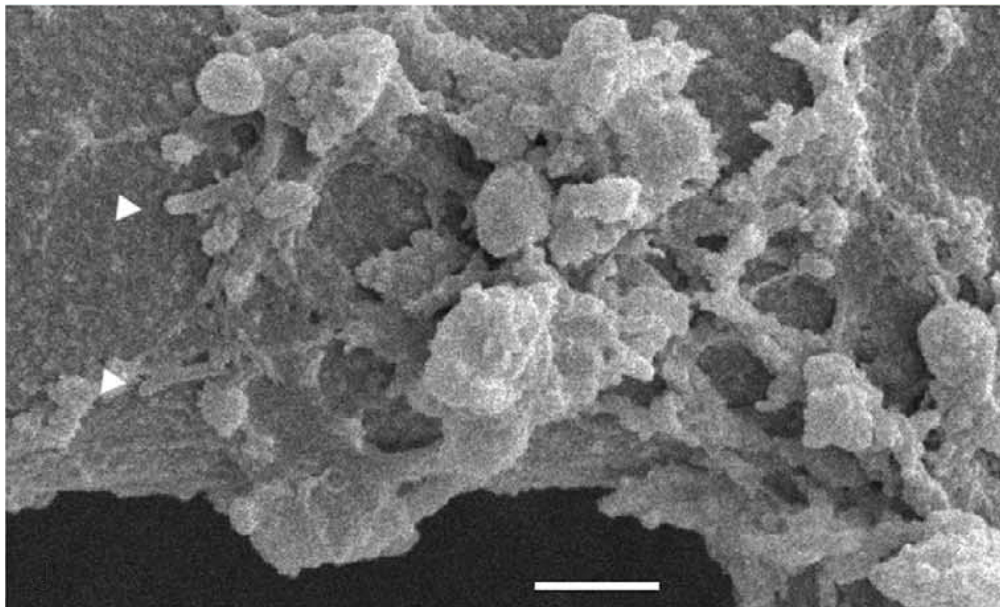
L'encapsulation des oeufs de la guêpe parasitoïde *Leptopilina Boulardi* repose sur l'intervention des lamellocytes et une réaction de mélanisation. (a) La guêpe *Leptopilina Boulardi* et des larves de drosophile. (b) Un oeuf encapsulé et mélanisé. Des lamellocytes sont visibles (*). Photographié de M. Meister. (c) Un oeuf de guêpe encapsulé et mélanisé dans une larve. Barre : 1mm. (d) Deux oeufs de guêpe encapsulés et mélanisés chez l'adulte. Les photos (c, d) sont tirées de [39].



(a) Production de fibres lors de la réaction de coagulation



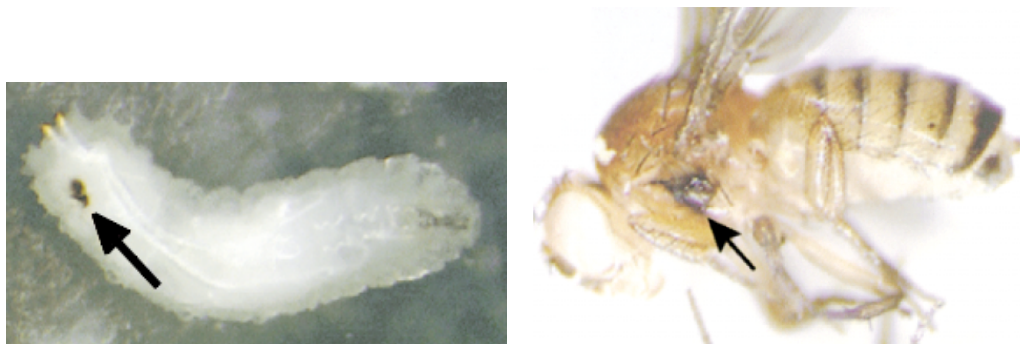
(b) Des hémocytes sont associés aux fibres



(c) Des bactéries sont immobilisées dans les fibres

FIGURE 1.8 – Coagulation *ex vivo* de l'hémolymph de la larve de drosophile

L'hémolymph de larves de drosophile déposée sur une lame de verre coagule. (a) Des longues fibres sont formées lors de la coagulation. 5 minutes après le dépôt de l'hémolymph sur la lame de verre, une aiguille est plongée dans l'hémolymph, et permet de visualiser ces fibres. (b) Des hémocytes sont associés aux fibres. (c) Photo du coagulat prise en Microscopie Electronique. Des bactéries sont visibles (pointes de flèche blanches). En imagerie classique (lumière blanche) ces bactéries sont immobiles alors que des bactéries non associées aux fibres sont mobiles. Barre : 10 μ M. Photos tirées de (a,c) [21] ; (b) [135].



(a) Mélanisation chez la larve après piqure avec une aiguille propre

(b) Mélanisation chez l'adulte après piqure avec une aiguille contaminée

FIGURE 1.9 – Réaction de mélanisation chez la drosophile

L'adulte présenté ici est mutant pour le gène codant la serpin 27A, et déclenche de ce fait une réaction de mélanisation plus importante que les individus sauvages. Photos tirées de [90].

1.6.5 La reconnaissance microbienne et la production de peptides antimicrobiens

Les microorganismes génèrent des molécules qui leur sont spécifiques, les "Microbial Associated Molecular Pattern" (MAMP), qui sont reconnues par les organismes multicellulaires par une classe de récepteurs qu'on appelle les "Pattern Recognition Receptor" (PRR). La drosophile possède comme PRR des "Peptidoglycan Recognition Proteins" (PGRP) et des "Gram Negative Binding Protein" (GNBP). Ils servent à moduler l'activité des voies de signalisation Toll et IMD, qui activent la production des peptides antimicrobiens.

1.6.5.1 Détection des microorganismes

Identifiés initialement comme des récepteurs aux bactéries à Gram-négatif chez *Bombyx Mori* [132], des études génétiques et biochimiques ont ensuite démontré que les GNBP sont des protéines impliquées directement ou indirectement dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif et des champignons chez la drosophile [86, 183, 88]. Elles contiennent un domaine N-terminal de liaison au β -(1,3)-glucane, constituant majeur des parois fongiques, et un domaine C-terminal qui présente des homologies avec le domaine catalytique des β -glucanases bactériennes. Cependant l'absence de résidus conservés dans le site catalytique suggère que ce domaine n'est pas fonctionnel chez la drosophile [252]. La fonction de deux GNBP a été identifiée chez la drosophile. GNBP3 est un PRR nécessaire à la reconnaissance fongique tandis que GNBP1, bien qu'elle possède un domaine de liaison aux glucanes, est nécessaire à la reconnaissance bactérienne. Trois gènes codant des GNBP ont été identifiés chez la drosophile (GNBP1, 2 et 3), ainsi que trois gènes codant une protéine possédant seulement un domaine N-terminal similaire à celui de GNBP3.

Les PGRPs forment une famille de protéines conservées des insectes aux mammifères dont la caractéristique principale est la présence d'un ou deux domaines PGRP potentiellement capables de lier le peptidoglycane des bactéries. Les PGRPs peuvent être sécrétées, intracellulaires ou transmembranaires. L'analyse de leurs séquences a permis de déterminer deux sous-groupes. Les PGRPs non catalytiques sont uniquement dédiés à la reconnaissance du peptidoglycane (PGRP-SA, SD, LA, LC, LD, LE et LF). Les PGRPs catalytiques ont conservé les acides aminés essentiels pour une activité amidasique (PGRP-SC1/2, LB, SB1/2) [43]. Ils ont la capacité avérée

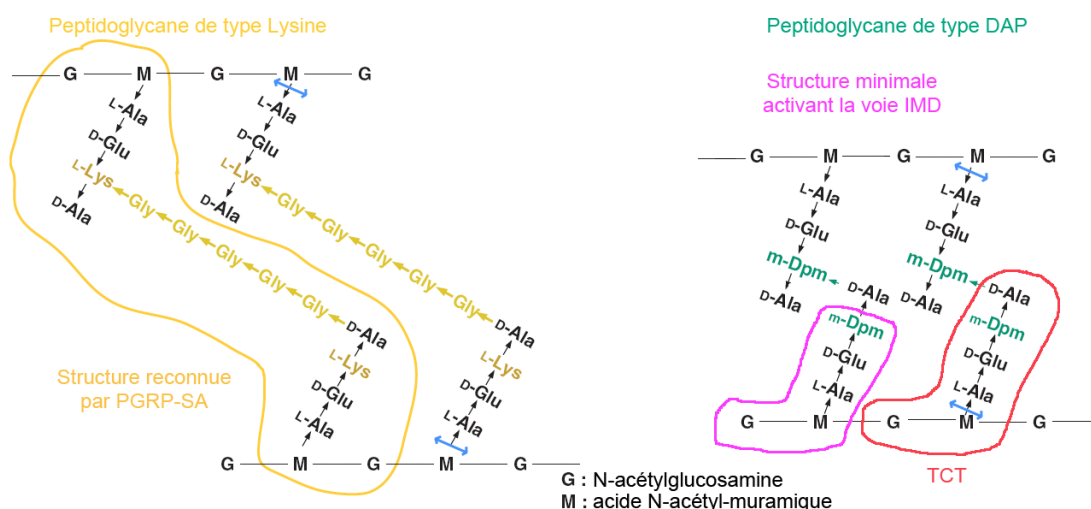


FIGURE 1.10 – La structure des deux types de peptidoglycane

Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif est généralement de type Lysine, et celui des bactéries à Gram négatif est généralement de type DAP (ou m-Dpm). Le site de coupure par les PGRP qui ont conservé une activité enzymatique amidasique est indiqué par les flèches bleues. Adapté de [125].

(PGRP-SC1A/B, LB et SB1) ou prédite (PGRP-SB2, SC2) d'hydrolyser la liaison lactylamide entre l'acide N-acétylmuramique du squelette osidique et le premier acide aminé de la sous-unité peptidique du polymère de peptidoglycane, éliminant alors les capacités immuno-stimulatrices de celui-ci [152, 250] (Figure 1.10, page 17).

1.6.5.2 Activation des voies de signalisation Toll et IMD

Les voies Toll et IMD sont activées suite à une infection bactérienne ou fongique. Le peptidoglycane est le composant bactérien majeur reconnu par les PRRs de l'hôte. Il est responsable de la réponse antibactérienne systémique. Les voies Toll et IMD sont activées par différents types de peptidoglycane, ce qui permet de discriminer les différents groupes bactériens et d'induire une réponse adaptée à la nature de l'infection. Le peptidoglycane contenant de la lysine (type Lys), présent dans la paroi des bactéries à Gram-positif de type coque, active préférentiellement la voie Toll, tandis que le peptidoglycane contenant de l'acide méso-diaminopimélique (type DAP), présent chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif de type bacille, est l'éliciteur de la voie IMD. L'injection de peptidoglycane purifié à partir de différentes classes de bactéries est suffisante pour reproduire ces activations sélectives [116, 136, 214].

Les récepteurs PGRP-LC et PGRP-LE fixent le peptidoglycane monomérique ou polymérique de type DAP en amont de la voie IMD [46, 47, 89, 116, 117, 168, 220, 221, 243]. Le motif minimal capable d'activer la voie est le disaccharide tripeptide GlcNAc,MurNAc,L-Ala, γ -D-Glu,meso-DAP [214]. Une forme spécifique appelé toxine cytotrachéal (TCT), qui contient un résidu alanine de plus, est naturellement relarguée par la bactérie durant son cycle cellulaire, et son potentiel d'activation de la voie IMD a fait l'objet de nombreuses études [82, 116, 117, 168, 214, 250, 251] (Figure 1.10, page 17). PGRP-LC est le principal récepteur de la voie IMD. Son expression peut mener après épissage alternatif à la synthèse de 3 isoformes distinctes, LCa, LCx et LCy, qui ont en commun leur domaine intracellulaire, mais divergent au niveau de leur domaine PGRP extracellulaire. PGRP-LCx est nécessaire à la reconnaissance du peptidoglycane polymérique, entraînant son homodimérisation, tandis que l'hétérodimerisation de PGRP-LCa et PGRP-LCx est

requis pour la liaison au peptidoglycane monomérique [116, 151, 168]. Le rôle de PGRP-LC est encore inconnu à ce jour. PGRP-LC interagit directement via son domaine intra-cytoplasmique avec IMD, permettant l'activation de la signalisation [46] (Figure 1.11, page 20).

PGRP-LE, quant à lui, est un récepteur intracellulaire ou sécrété, ne possédant ni peptide signal ni domaine transmembranaire [117, 221]. Sa surexpression induit la synthèse de Diptéricine et l'activation de la cascade de mélanisation [220]. PGRP-LE existe sous 2 formes : une forme longue intracellulaire qui agit comme récepteur de la TCT présent à l'intérieur de la cellule [124], en particulier au niveau de l'épithélium intestinal [168] ; et une forme extracellulaire présentant uniquement le domaine PGRP. Cette forme courte sert de co-récepteur à PGRP-LCx pour la reconnaissance de la TCT présente dans l'hémolymphe [168]. PGRP-LE serait capable de se multimériser [117, 221].

Les protéines sécrétées PGRP-SA détectent le peptidoglycane de type Lysine et activent la voie Toll [23, 86, 89, 156, 183, 240] (Figure 1.11, page 20). La structure minimale nécessaire à l'activation de la voie Toll est un dimère de tétrapeptides [78, 178] (Figure 1.10, page 17). Des données suggèrent que GGBP1 hydrolyse et présente le peptidoglycane à PGRP-SA, formant alors un complexe [240]. La protéine PGRP-SD serait également nécessaire à la reconnaissance et agirait de façon redondante avec PGRP-SA et GGBP1 [23]. La voie Toll est également activée suite à une infection fongique. Dans ce cas, le récepteur GGBP3 est nécessaire à l'activation de cette voie par des champignons. Ce récepteur, qui est la protéine la plus proche du récepteur au β -(1,3)-glucane de lépidoptère, reconnaît directement le glucane, composant essentiel de la paroi des champignons [88].

L'induction de la voie Toll passe également par des mécanismes indépendants des MAMPs et des PRRs [41]. Les protéases produites par les bactéries à Gram positif ou les champignons, ainsi que les chitinases fongiques synthétisées par les spores, se retrouvent dans l'hémolymphe de l'hôte lors d'une infection systémique. Ces enzymes exogènes exercent une activité de protéolyse sur des protéines de l'hôte qui est perçue comme anormale et interprétée comme un signal de danger. Ce signal de danger est reconnu par la protéase Persephone qui active alors la voie Toll de façon GGBP-3 indépendante [88, 141, 41].

Des similitudes remarquables existent entre la voie Toll chez la drosophile et la voie du récepteur de l'interleukine 1 chez les mammifères. En particulier, ces deux récepteurs transmembranaires possèdent le même domaine intracellulaire, nommé TIR ("Toll / Interleukine 1 Receptor") en référence à leur partage, qui recrute des partenaires homologues (Pelle / IRAK) via un adaptateur conservé (MyD88), et induit la translocation nucléaire d'un facteur de transcription de la famille NF- κ B. De son côté, la voie IMD est particulièrement proche de la voie du récepteur au TNF ("Tumor Necrosis Factor") des mammifères. En plus de la similarité au niveau du facteur de transcription, elle possède parmi ses membres intracellulaires les protéines IAP2, TAB2, TAK1, IKK β et IKK γ qui sont les homologues des protéines du même nom chez les mammifères, ainsi que IMD / RIP, FADD / TRADD et Dredd / Caspase 8 [73].

1.6.6 La réponse immunitaire aux infections systémiques

La présence de microorganismes dans l'hémolymphe de la drosophile constitue une infection systémique. Elle peut être produite suite à une blessure naturelle comprenant une perforation de la cuticule de l'exosquelette, ou provoquée artificiellement par une blessure septique¹ ou par une injection dans la cavité de l'animal d'une solution contenant des bactéries. Les réactions immédiates sont la coagulation, la mélanisation, et le recrutement des hémocytes au site de blessure. Les hémocytes sont potentiellement impliqués dans l'élimination des bactéries par phagocytose,

1. Une blessure septique consiste à piquer l'animal avec une aiguille préalablement trempée dans une solution contenant des bactéries

et éventuellement dans la signalisation vers le corps gras de la présence des bactéries via la sécrétion de la cytokine Spätzle. Un évènement caractéristique de la réponse aux infections systémiques est la sécrétion massive de peptides antimicrobiens par le corps gras, sous contrôle des voies de signalisation Toll et/ou IMD selon le(s) microorganisme(s) impliqué(s). Cette réaction est induite consécutivement à la détection de la présence des microorganismes, et nécessite plus de temps pour être mise en place que les réponses cellulaires et biochimiques. Elle est essentielle pour la défense de l'organisme, et les mutants des voies de signalisation Toll ou IMD, qui n'induisent pas la sécrétion massive des peptides antimicrobiens par le corps gras lors d'une telle infection, ne résistent généralement pas aux dégâts liés à la présence du microbe et meurent rapidement.

La sécrétion massive de peptides antimicrobiens par le corps gras peut aussi être induite par la présence de certains microorganismes dans le tube digestif, telles les bactéries *Pseudomonas entomophila* chez la larve comme chez l'adulte, ou *Erwinia carotovora carotovora 15* chez la larve.

1.7 Objectif de mon travail de thèse

A l'époque où je commençais ma thèse, en 2008, la réponse humorale de la drosophile à une infection systémique avait été largement étudiée. Il était bien connu que la sécrétion massive de peptides antimicrobiens par le corps gras est essentielle à la résistance et à la survie de la drosophile face aux infections qu'un expérimentateur peut lui infliger par blessure septique. Cependant, le rôle des cellules circulantes, les hémocytes, dans la réponse aux infections systémiques restait assez peu étudié. Des travaux alors très récents venaient de montrer que l'insecte *Tenebrio molitor* élimine plus de 99% des bactéries *Staphylococcus aureus* qu'on lui injecte en moins de temps qu'il ne faut pour activer la sécrétion massive des peptides antimicrobiens [95]. Ces résultats suggéraient que la réponse antibactérienne systémique de cet insecte repose premièrement sur une activité bactéricide indépendante des peptides antimicrobiens, et qu'ensuite la synthèse de ces peptides permet de maintenir sous contrôle les quelques bactéries survivantes. L'hypothèse avancée est que les hémocytes, par leur fonction phagocytaire, sont responsables de l'élimination précoce de la bactérie.

J'ai voulu voir si ce phénomène pouvait s'observer chez la drosophile. J'ai donc entrepris d'étudier la réponse cellulaire aux infections systémiques bactériennes chez l'adulte, avec pour objectif le fait de déterminer leur contribution à la résistance et la survie de l'animal. Pour cela, j'ai généré des drosophiles dépourvues d'hémocytes, et je les ai soumises à une série d'infections bactériennes systémiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre "Infection" de ma thèse. Ils démontrent que les hémocytes sont requis pour résister aux infections par certaines espèces bactériennes, dont *Staphylococcus aureus*, mais pas à toutes. De plus, ils renforcent l'hypothèse qui propose que c'est par leur activité de phagocytose qu'ils médient ce phénotype en confirmant le rôle essentiel du gène *eater*, un récepteur transmembranaire impliqué dans la phagocytose de *Staphylococcus aureus*, dans la capacité de résistance médiée par les hémocytes lors de l'infection.

Les résultats acquis lors de cette étude ont par ailleurs permis d'établir une corrélation entre la présence de microorganisme dans l'environnement de la drosophile et sa capacité de survie dans le milieu, tant durant les stades larvaires que chez l'adulte. Cette observation m'a poussé à considérer les relations naturelles qui se produisent entre la drosophile et les microbes de son environnement. J'ai donc voulu caractériser la flore bactérienne commensale de la drosophile, et étudier l'impact de la présence d'une telle flore sur l'homéostasie intestinale et la physiologie de l'organisme. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre "Commensalisme".

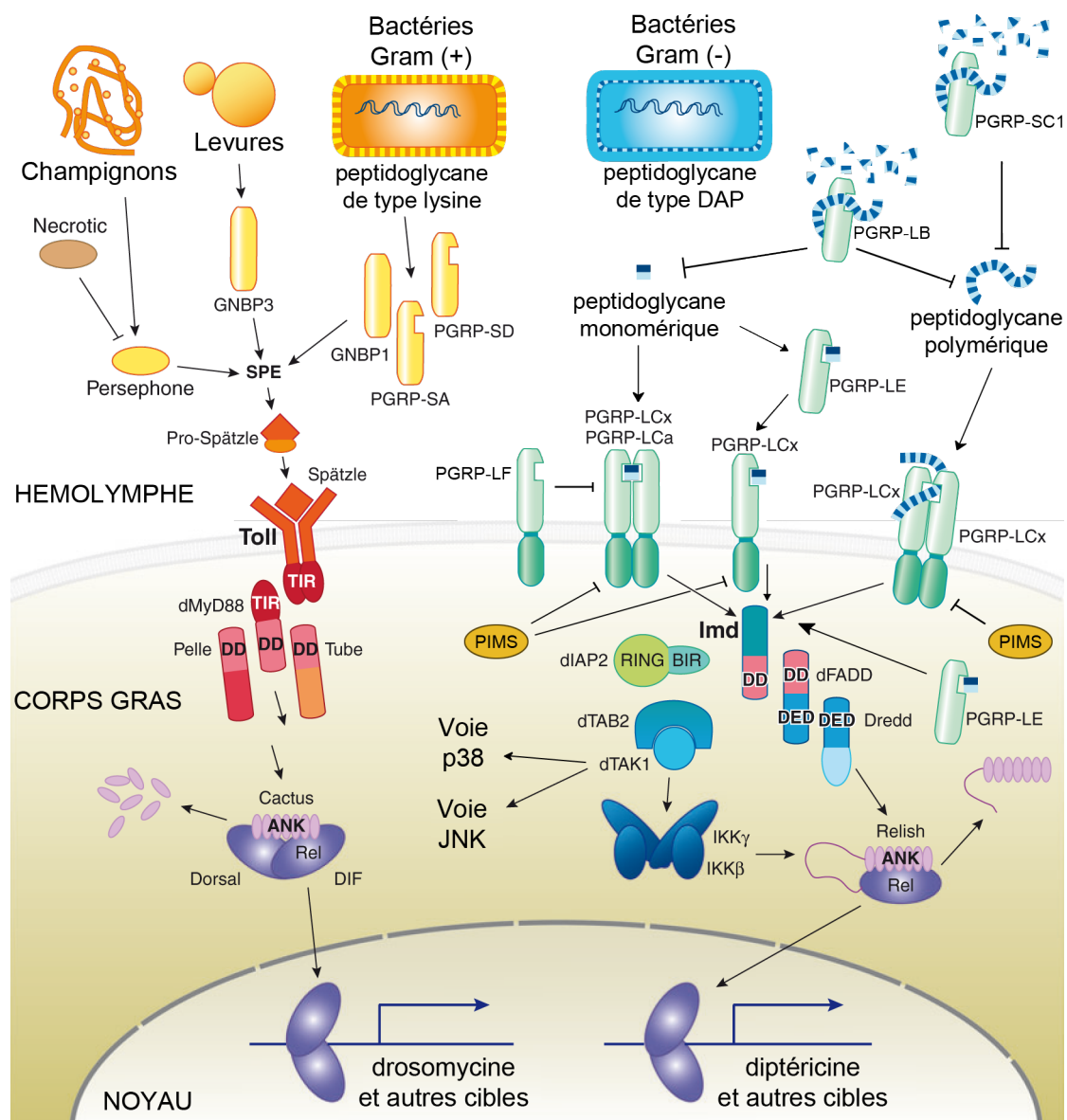


FIGURE 1.11 – Les voies de signalisation Toll et IMD

Les voies de signalisation Toll et IMD contrôlent l'activation de facteurs de transcription de type NF- κ B. La voie Toll est principalement activée par la détection de champignons, levures et bactéries à peptidoglycane de type Lysine. Elle est activée par la fixation du ligand Spätzle sur le récepteur Toll, qui est produit dans l'hémolymphe par clivage d'une forme immature. Elle active (entre autres) l'expression du peptide antimicrobien drosomycine. La voie IMD est principalement activée par la détection de bactéries possédant du peptidoglycane de type DAP, donc généralement de type Gram négatif. Elle est reliée aux voies de signalisation JNK et p38. PGRP-LF inhibe PGRP-LC et son activité est requise au cours du développement pour éviter une surexpression de la voie JNK dans les disques imaginaux (Figure 1.2, page 5). Pims inhibe PGRP-LC en perturbant sa localisation sub-cellulaire. PGRP-LB dégrade le peptidoglycane polymérique et ses formes monomériques, PGRP-SC1 dégrade la forme polymérique mais pas les formes monomériques. Une autre PGRP catalytique, PGRP-SB1, dégrade le peptidoglycane polymérique de type DAP, mais sans rôle majeur dans l'immunité. PGRP-LE peut être sécrété ou intracellulaire. Il reconnaît uniquement le peptidoglycane monomérique. La voie IMD active (entre autres) l'expression du peptide antimicrobien diptéricine. Basé sur [135, 139, 145, 168, 250, 251] et adapté de [135].

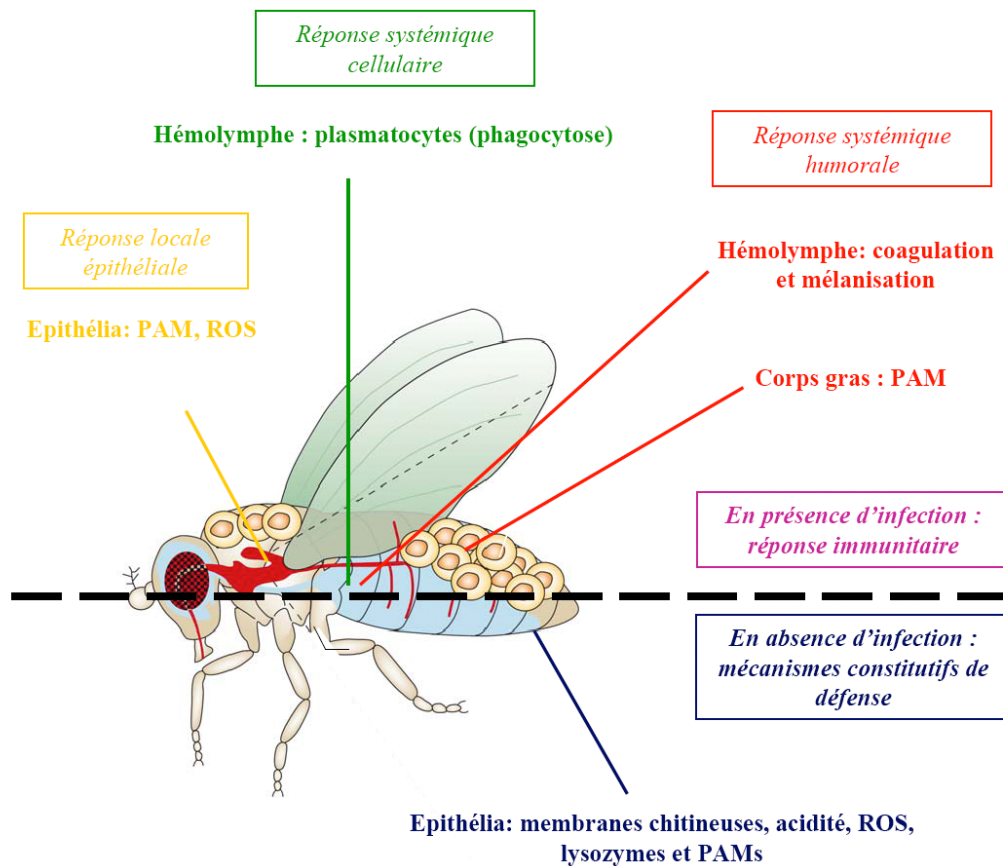


FIGURE 1.12 – Vue d'ensemble des défenses de la drosophile adulte.

En présence d'une infection, une réponse locale et/ou systémique est mise en place, comprenant des réactions cellulaires (phagocytose), biochimiques (mélanisation, coagulation), et humorales (synthèse de peptides antimicrobiens "PAM", et d'espèces réactives de l'oxygène "ROS"). Les réponses cellulaires et biochimiques peuvent être considérées comme "constitutives" car immédiatement effectives lors de la détection des microbes. En effet, la coagulation, la mélanisation et la réponse cellulaire sont des processus dont l'exécution est de l'ordre de la minute. En revanche, la cinétique de synthèse des peptides antimicrobiens est de l'ordre de l'heure, et peut de ce fait être considérée comme "induite". En absence d'infection, des mécanismes de défense constitutifs existent sous la forme de barrières physiques (chitine) et biochimiques (AMP, ROS, pH, lysozyme) qui empêchent l'introduction de corps étrangers. Adapté de [122].

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

2.1 Maintien des lignées de drosophiles

2.1.1 Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette

Les lignées de drosophiles que j'ai utilisées sont entretenues dans des incubateurs à 25°C, avec un cycle de 12 heures d'éclairage et de 12 heures d'obscurité. Elle sont maintenues dans des tubes de 50 millilitres de volume, contenant 10-15 millilitres de nourriture dans le fond, et bouchés avec des morceaux de coton simples. La nourriture qui leur est donnée est de la composition suivante (pour un litre) : Agar : 8.4g, poudre de maïs : 80g, extrait de levure : 40g, jus de fruits multifruits : 80 millilitres, Moldex : 5g. Les drosophiles sont transférées dans des tubes frais quelque jours après leur émergence, et laissées pour pondre sur le milieu jusqu'à la pupaison de la génération suivante, où elles sont soit transférées dans un nouveau tube (pour amplifier le stock), soit éliminées.

2.1.2 Institut de Biologie du Développement de Marseille Luminy, Marseille

Les lignées de drosophiles que j'ai utilisées sont entretenues dans des incubateurs à 25°C, avec un cycle de 12 heures d'éclairage et de 12 heures d'obscurité. Elle sont maintenues dans des tubes de 50 millilitres de volume, contenant 10-15 millilitres de nourriture dans le fond, et bouchés avec un bouchon en coton dense pour éviter l'infiltration d'acariens. La nourriture qui leur est donnée est de la composition suivante (pour un litre) : Agar : 8.16g, poudre de maïs : 80g, extrait de levure : 80g, Moldex : 5.2g, acide propionique (99%) : 4 millilitres. Les drosophiles sont transférées dans des tubes frais quelque jours après leur émergence, et laissées pour pondre sur le milieu jusqu'à la pupaison de la génération suivante, où elles sont soit transférées dans un nouveau tube (pour amplifier le stock), soit éliminées.

2.1.3 Cultures axéniques

Les cultures axéniques étaient initialement basées sur la stérilisation d'embryons puis leur mise en développement dans des tubes autoclavés. La stérilisation des embryons est effectuée en leur faisant passer un bain de 2 minutes dans de l'eau de javel diluée à 2.7%, puis 2 minutes dans de l'éthanol à 70%, puis un rinçage de 2 minutes dans de l'eau distillée autoclavée. Les tubes contenant de la nourriture standard (selon l'institut) étaient autoclavés 15 minutes à 110°C,

soit avec des bouchons en plastiques résistant à l'autoclave, soit sans bouchon, auquel cas des bouchons en coton dense exposés à un rayonnement ultraviolet (XYZ nm) pendant 10 minutes (dans une cuve à U.V. *UV Stratalinker 1800* de Stratagene) étaient utilisés pour boucher les tubes après leur autoclavage. Des tubes autoclavés étaient préparés en routine pour permettre le transfert régulier des drosophiles dans des tubes frais.

Dans un deuxième temps, les cultures axéniques ont été maintenues dans des tubes contenant la nourriture standard mais supplémentée avec un cocktail d'antibiotique, sans être autoclavée. Le cocktail d'antibiotique comprend : Ampicilline (50mg/mL), Kanamicine (50mg/mL), Erythromycine (10mg/mL) et Tetracycline (5mg/mL). Les antibiotiques sont ajoutés dans la nourriture lorsqu'elle est encore liquide, mais à une température inférieure à 60°C. J'ai utilisé cette méthode de culture des individus axéniques pour les travaux présentés dans le chapitre "Commensalisme" de ma thèse.

Dans tous les cas, le statut axénique de mes stocks était vérifié régulièrement (une à deux fois par mois) ainsi qu'au cours de chaque expérience en broyant une dizaine d'individus dans 500 millilitres de milieu de culture bactérienne LB, et en étalant 100 à 200 microlitres du broyat sur des milieux gélosés LB ou BHI. Après 48 heures d'incubation à 37°C, je vérifiais qu'il n'y avait pas eu de croissance bactérienne sur les milieux. Il est arrivé que des vieux tubes (plus de 2 semaines après l'émergence des adultes) soient contaminés, auquel cas ils étaient éliminés, ainsi que ceux qui avaient été nouvellement établis par des individus issus de ces tubes.

2.2 Expériences de longévité

Afin d'optimiser le fonctionnement du système d'interférence par ARN, les expériences sur la longévité ont été menées à 29°C. Les mâles et les femelles ont été conservés séparément, par groupe de 20 individus par tubes. Les drosophiles ont été transférées dans des tubes frais 2 fois par semaine, et le nombre de survivant était compté quotidiennement.

2.3 Cultures bactériennes

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus brevis* étaient cultivées dans 40 millilitres de milieu MRS dans un tube Falcon de 50 millilitres, à 37°C, sans agitation. *Commensalibacter intestini*, *Acetobacter pomorum* étaient cultivées dans 50 millilitres de milieu Mannitol, en bécher de 250 ou 500 millilitres, à 29°C, avec agitation. *Enterococcus faecalis* était cultivée en milieu LB ou BHI à 37°C avec agitation.

Les milieux étaient préférentiellement ensemencés à partir d'une colonie piquée d'une boîte de milieu gélosé, elles-mêmes préparées à partir d'un stock maintenu à -80°C dans du glycérol 20%, mais parfois directement à partir du stock glycérol. Les cultures sur boîtes de milieu gélosé étaient incubées aux mêmes températures que les cultures liquides.

Préparation du milieu Mannitol : Dans 1 litre d'eau distillée : 3g de Bacto peptone (Difco, 0118-17), 5g d'extraits de levure (Difco, 212750), 25g de D-Mannitol (Sigma, M1902-500g), 15g d'agar (optionnel). Autoclaver 20 minutes à 120°C. Les milieux LB, BHI et MRS ont été faits en utilisant des préparations commerciales.

2.4 Recolonisation

Les drosophiles qui se sont développées en condition axénique étaient prélevés dans les 48 heures suivant leur émergence, et placées par groupes d'environ 30 individus (20 femelles + 10

mâles) dans des tubes standard (sans antibiotiques) au fond desquels était déposée une pastille de papier ("Chromatography paper 3mm", de *Whatman*, catégorie 3030 917) autoclavée, en surface de la nourriture. Sur cette pastille était déposé 150 microlitres d'une solution composée de 75 microlitres de saccharose 5% préalablement filtrée (filtre à pores de 0.2 micromètres, "Pall Acrodisc Supor Membrane 32mm" de *LifeSciences*), ramenée à 2.5% au final, avec au choix : (1) 75 microlitres d'un mélange de 4 cultures bactériennes (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Commensalibacter intestini*, *Acetobacter pomorum*) d'une densité optique initiale de 1.0 chacune (ramenée à 0.125 dans le mélange final avec le saccharose) ou (2) 75 microlitres d'un mélange volume : volume de MRS (le milieu de culture utilisé pour *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis*) et de Mannitol (le milieu de culture utilisé pour *Commensalibacter intestini* et *Acetobacter pomorum*).

Pour la collecte des échantillons de l'analyse transcriptomique, les individus étaient placés dans les tubes avec bactéries ou sans bactéries pendant 5 jours et étaient transférés dans des nouveaux tubes contenant également des bactéries fraîches ou les solutions de culture 2 fois dans la période des 5 jours. Il est à noter dans ce cas particulier que la culture bactérienne de *Commensalibacter intestini* était contaminée avec une souche de *Serratia marcescens*. Les charges bactériennes ont été vérifiées à la fin du processus de recolonisation.

Pour les autres expérimentations, les individus étaient incubés dans ces tubes pendant 7 jours, et étaient transférés dans des tubes identiques nouvellement préparés 3 fois dans la période des 7 jours. La charge bactérienne des individus était vérifiée au jour 5 de la période de recolonisation pour s'assurer qu'elle était conforme à ce que j'attendais. Si elle n'était pas conforme, j'éliminais les individus en cours de recolonisation et je recommençais le processus avec un nouveau lot d'individus.

2.5 Mesure des charges bactériennes

Les charges bactériennes sont évaluées en étalant des dilutions de broyats de drosophiles entières sur des milieux gélosés de culture bactériennes. Après avoir été stérilisées en surface par un bain d'éthanol à 70% pendant 30 secondes (et agitation vigoureuse au vortex), 5 drosophiles (en général des femelles) sont broyées dans 500 microlitres de milieu de culture bactérien liquide stérile (un mélange volume à volume de MRS et Mannitol). Le broyage se fait à l'aide de l'homo-généisateur de tissu *Precellys 24* de Bertin Technologies, en plaçant les mouches dans des tubes de 1.5 millilitres de volume contenant 100 microlitres de billes de verre d'un diamètre compris entre 0.75 millimètre et 1 millimètre, et avec un programme d'agitation de 2 fois 20 secondes à 6300rpm séparées de 25 secondes de pause. 100 microlitres des dilutions 1 :1000 et 1 :10000 sont étalées sur milieux MRS (favorise la culture des Lactobacilles) et 100 microlitre sont étalés sur milieu Mannitol (favorise la culture de *Acetobacter pomorum* et *Commensalibacter intestini*). Les boîtes sont incubées pendant 48 heures à 37°C (MRS) ou 29°C (Mannitol). Les colonies qui se sont formées en surface de la gélose sont comptées, puis la charge bactérienne est enregistrée en "Unités Formant Colonie" (UFC) par individu.

2.6 Crible génétique par ARN interférence dans les hémocytes

Les individus étaient soumis à une infection systémique selon le protocole décrit dans l'article 1. Les infections par *Staphylococcus aureus* étaient faites avec une solution bactérienne à DO10, les drosophiles étaient ensuite maintenues à 25°C. Les infections par *Salmonella typhimurium*

étaient faites avec une solution bactérienne à DO200, les drosophiles étaient ensuite maintenues à 29°C. Le nombre de survivant était compté matins et soirs jusqu'à la mort du dernier individu. Les drosophiles étaient transférées dans des tubes frais 2 fois par semaine.

2.7 Création et analyse des banques de séquences codant l'ARNr 16S isolées à partir des drosophiles

Principe et détails techniques de la démarche

Notre démarche consiste à extraire l'ensemble des molécules d'ADN génomique bactérien à partir de mouches entières ou bien d'intestins isolés, à l'aide du kit "Ultra Clean Microbial gDNA" de *MoBio Laboratories*. Les individus sont âgés de deux semaines, et élevés en condition conventionnelle. Les drosophiles ont été lavées dans de l'éthanol à 70% et rincées dans de l'eau autoclavée 2 fois pendant 30 secondes avant d'en extraire les ADN génomiques bactériens. Après extraction et purification de cet ADN, le gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique est amplifié par PCR en utilisant les amorces universelles 8FE et 1492R¹ [242]. Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit "QIAquick PCR Purification Kit" de *Qiagen* et clonés dans les vecteurs plasmidiques fournis dans le kit "PGEM-T Easy" de *Promega*. Les vecteurs sont transformés dans des bactéries DH5 α par électroporation puis amplifiés par culture des populations bactériennes transformées. Les clones sont extraits et purifiés par le kit "Miniprep" de *Qiagen*, puis envoyés à un service de séquençage commercial (Beckman Coulter Genomics). Les amorces utilisées pour le séquençage sont la SP6 et la T7, qui encadrent le site d'insertion du produit de PCR dans le vecteur (voir en annexe la figure 6.1, page 120). Les séquences obtenues sont rognées pour ne contenir que la portion comprise entre les deux amorces 8FE et 1492R, puis elles sont alignées à l'aide de l'algorithme Clustal disponible sur le site de Mobyle @ Pasteur². Un arbre de distance, dont le but est de regrouper les séquences les unes avec les autres selon leur ressemblance, est ensuite construit avec le logiciel SeaView³ par la méthode de Neighbor Joining [196]. Les séquences qui partagent 98% ou plus d'identité entre elles sont rassemblées dans un groupe, et mises à l'écart des séquences qui partagent moins de 98% d'identité avec elles. On considère ces groupes de séquences comme représentant une espèce bactérienne particulière, ou une "Unité Taxonomique Opérationnelle", qui est différente entre chaque groupe. Ces groupes sont aussi appelés des "phylotypes", un terme qui prend en considération la notion d'évolution génétique dans la détermination des relations (diversité génétique) entre groupes. Pour identifier l'espèce bactérienne en question, le groupe entier est comparé aux séquences contenues dans la base de données GenBank⁴ par l'intermédiaire du site leBiBi⁵. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR), a aussi été menée sur un contrôle négatif contenant uniquement de l'eau. Cette réaction permet de déterminer, le cas échéant, quelles sont les espèces contaminantes issues de l'eau et non des drosophiles. Les espèces ainsi détectées sont listées dans la table 4.1, page 64, et les clones qui correspondaient à ces espèces dans les 4 banques de séquences n'ont pas été considérés pour l'analyse phylogénétique.

Limites de la démarche et considérations statistiques des résultats

1. Les amorces sont dites "universelles" car elles peuvent servir à amplifier le gène codant l'ARNr 16S de toutes les espèces bactériennes. Séquences : 8FE (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') et 1492R (5'-GGM TAC CTT GTT ACG ACT T-3')

2. <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>

3. <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>

4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

5. <http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>

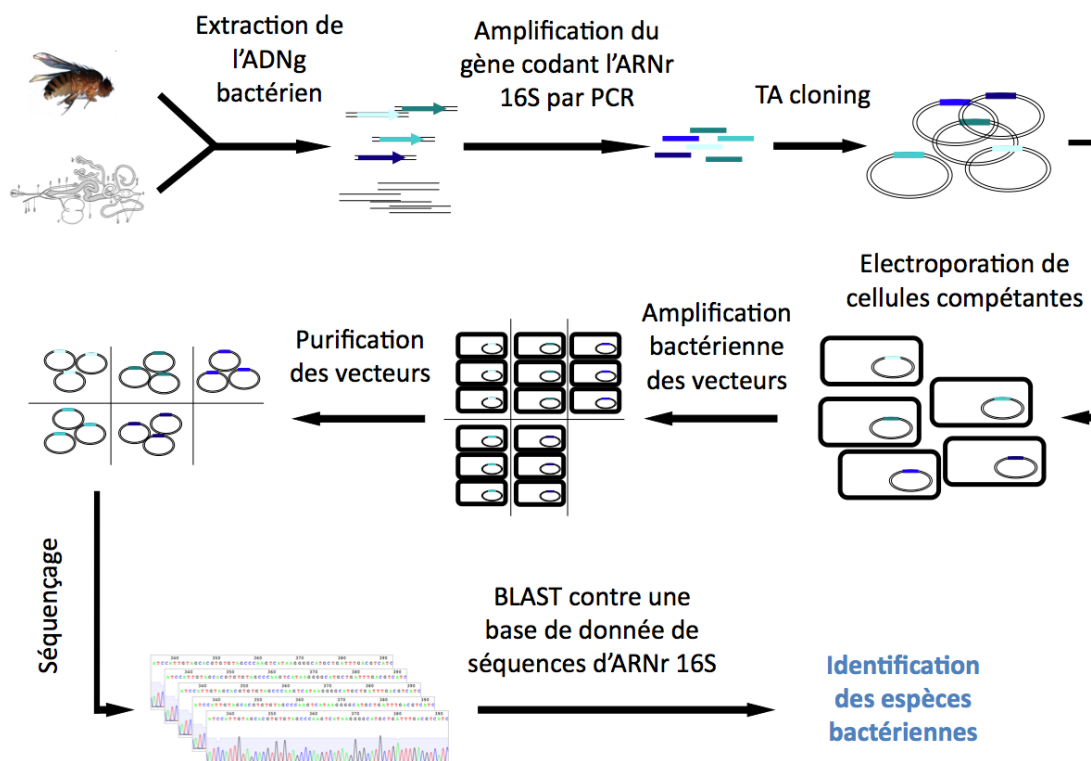


FIGURE 2.1 – Méthode d'identification des espèces bactériennes de la flore commensale des drosophiles par séquençage du gène codant l'ARNr 16S.

Il faut préciser que la démarche d'identification entreprise ici ne doit pas être considérée comme quantitative. C'est à dire qu'elle ne permet pas de déterminer avec précision la proportion relative d'une espèce par rapport à l'ensemble de la communauté. De plus, différentes espèces bactériennes possèdent un nombre différent de copie du gène 16S au sein de leur génome, ce qui ne permet pas d'établir une relation directe entre le nombre de copie de molécules portant la séquence de ce gène et le nombre de cellules de cette espèce [1, 53]. Par exemple, *Lactobacillus plantarum* (souche WCFS1) possède 5 copies du gène 16S dans son génome, et *Enterococcus faecalis* (souche V583) en possède 4 [1, 53]. Cependant, même si cette approche ne donne pas de mesure précise de la proportion de chaque espèce, elle peut néanmoins donner une tendance générale, pour différencier globalement les espèces abondantes des espèces peu abondantes.

Il est possible aussi que notre étude ne soit pas saturante, c'est à dire qu'elle n'ait pas détecté toutes les espèces présentes mais seulement les plus représentées. En effet, les échantillons (nombre de clones séquencés) sur lesquels j'ai travaillé ne représentent peut-être pas la diversité totale des espèces présentes dans les tissus biologiques étudiés. Il existe des méthodes statistiques pour estimer la richesse de cette diversité (nombre d'espèces différentes) en se basant sur les données acquises. Il est possible d'estimer visuellement la saturation de notre étude en construisant une courbe de raréfaction. Le principe est de tracer le nombre d'espèces différentes identifiées (en ordonnée) par rapport au nombre de clones séquencés (en abscisse). L'idée sous-jacente est que lorsque cette courbe atteint un plateau, on peut considérer que la majorité des espèces présentes

a été détectée. Il existe aussi des outils statistiques qui peuvent nous aider à estimer la diversité réelle de la population, comme par exemple les estimateurs Chao et ACE [56, 105]. Dans mon cas, j’ai construit la courbe de raréfaction de mes données en utilisant la librairie *permute* [210] dans l’environnement R (2.15.1 GUI 1.52 Leopard Build 32-bit) [224], et j’ai obtenu les estimations Chao et ACE en utilisant la librairie *vegan* [172] dans le même environnement.

Par ailleurs, je ne peux pas exclure que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ne soit pas biaisée, c’est à dire qu’elle amplifie les molécules d’ADN génomiques issues de toutes les espèces bactériennes avec la même efficacité. Si elle amplifie la séquence d’une espèce particulière plus efficacement que les autres, cette séquence sera sur représentée dans la population finale de produits de PCR, et il en résulte une surestimation de la présence de cette espèce au sein de la population. Mais, comme je l’ai dit précédemment, cela ne me pose en l’occurrence pas de véritable problème, puisque mon but n’est pas de quantifier les proportions relatives des différentes espèces. En revanche, si la PCR est biaisée dans le sens d’une efficacité d’amplification moindre concernant une espèce particulière par rapport aux autres, il est possible que cette espèce ne soit pas détectée dans la population, auquel cas le résultat de la PCR sous estime la diversité de la population. Cependant, étant donné que le gène codant l’ARN 16S évolue peu, et que par conséquent sa séquence est peu divergente entre espèces, il y a peu de risque que la réaction de PCR présente un biais. Pour le vérifier, il faudrait effectuer la PCR sur une population comprenant des quantités connues de clones contenant des séquences issues de plusieurs espèces, et vérifier si les produits de PCR correspondants à chaque espèce sont dans les mêmes proportions que les matrices initiales.

2.8 Homeostasie de l’épithélium intestinal en réponse à divers stress

La dissection des intestins moyens pour l’imagerie de fluorescence a été faite dans du PBS froid (maintenu dans la glace). Les tissus ont été fixé 10 minutes dans du paraformaldéhyde à 4%, puis recouvert de la solution "Vectashield Mounting Medium" contenant du DAPI de *Vector Laboratories*. Les observations ont été faites sur un microscope Zeiss Axio Imager.M2, et les photos prises par une caméra Zeiss AxioCam HRC. Toutes les drosophiles utilisées étaient des femelles.

La réponse à la présence de la bactérie *Lactobacillus plantarum* a été mesurée après 5 jours d’incubation des drosophiles à 25°C sur un milieu nutritif standard en surface duquel avait été déposés 100 microlitres d’une solution bactérienne à DO=1. Les drosophiles, initialement axéniques, avaient entre 2 et 3 jours lorsqu’elles ont été placées dans cet environnement. Après 5 jours, les intestins ont été disséqués et observés en microscopie à fluorescence.

La réponse à l’infection par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora 15* a été mesurée après 24 heures d’incubation en présence de la bactérie à 25°C. La bactérie était mélangée à une solution de saccharose de sorte que le mélange final contenait 2.5% de saccharose et une concentration de bactérie équivalente à une densité optique de 100, 25 ou 5. Les individus utilisés avaient entre 7 et 10 jours au début de l’infection.

La réponse au stress provoqué par l’ingestion de Dextran Sodium Sulfate (DSS) a été mesurée après 48 heures d’incubation des individus avec une solution nutritive contenant 2.5% de saccharose et des concentrations variables de DSS (3%, 1%, 0.3%), à 25°C. Les drosophiles avaient entre 7 et 10 jours au début de l’incubation.

2.9 Analyse de la physiologie intestinale

Les expériences d'analyse de la physiologie intestinale présentées ici ont été faites avec des femelles uniquement. Les drosophiles sont réparties par groupes de 8 dans des petites boîtes de pétri en plastique transparent. un bloc de nourriture additionné d'indicateur de pH est placé dans la boîte. Les boîtes sont incubées à l'envers (posées sur leur couvercle) à 25°C pendant 60 heures (sur le temps d'un weekend : vendredi soir à lundi matin) dans un incubateur classique, avec un cycle de 12H/12H de lumière et d'obscurité. Il est optimal de préincuber les drosophiles avec la nourriture contenant l'indicateur de pH pendant quelques heures avant le début de l'expérience, afin qu'elles produisent des déjections marquées par l'indicateur de pH dès le début de l'expérience. J'ai ainsi préincubé les drosophiles de la première expérience (Impact de la flore) pendant 4 heures, mais pas celles de la seconde expérience (Impact de l'infection).

A la fin de l'incubation, 5 des 8 mouches sont utilisées pour mesurer leur charge bactérienne selon le protocole décrit dans la section 2.5, page 24. Dans l'expérience d'étude de l'effet de la flore (Axéniques / Recolonisés), les 3 mouches restantes ont été utilisées pour mesurer la capacité de contenance de nourriture de l'organisme selon le protocole décrit dans la section 2.10, page 28. Dans l'expérience d'étude de l'effet de l'infection (Recolonisés non infectés / Recolonisés infectés) les 3 mouches restantes ont été éliminées.

La composition de la nourriture est la suivante : Extraits de levure : 36g/L, Saccharose : 54g/L, Nipagin : 1.8g/L, Bleu de Bromophenol : 5g/L. Le pH est amené à 5.5.

Les couvercles des boîtes de pétri sur lesquelles les drosophiles ont déposé leur déjections sont numérisés à l'aide d'un scanner Epson *Perfection v200 Photo* et du logiciel *Epson Scan Software* selon les paramètres suivants : Type de document : reflectif, Source du document : Document Table, Type d'autoexposition : Document, Capture : 24bits 1200dpi, Enregistrées au format TIFF. Les images sont ensuite travaillées avec le logiciel de traitement d'images Adobe *Photoshop CS4* pour éliminer de l'image le contour plastique de la boîte de petri et d'une manière générale toutes les zones de l'image qui ne correspondent pas au fond de la boîte de pétri. L'image retravaillée est enregistrée en mode RGB, puis analysée par le logiciel développé par Matt Wayland dans le cadre du projet conduit par Irene Miguel-Aliaga. Les paramètres d'utilisation du logiciel sont les suivants : offset : 0.1, Size of moving window : 50px*50px, Erode then dilate image features : yes, Brush Size : 3px, Brush shape : diamond, Fill holes in features : yes, Filter on size : yes, Minimum area : 50px.

Les données issues de l'analyse du logiciel sont exportées au format CSV, puis leur contenu est exploité dans le logiciel R (2.15.1 GUI 1.52 Leopard Build 32-bit) [224] pour produire les graphiques et appliquer les tests statistiques. Les tests statistiques sont les suivants : Nombre de déjections, Acircularité et Taille (surface) : Kruskal-Wallis sur l'ensemble des données, puis Wilcoxon sur les comparaisons 2 à 2. Couleur et Luminance : Kolmogorov-Smirnov 2 à 2. La normalité des distributions est vérifiée par le test de Shapiro et la production de QQ-Plots.

2.10 Mesure de la capacité de contenance de nourriture des drosophiles

A la fin de la période d'incubation des drosophiles dans les boîtes de pétri dans le cadre de l'analyse de la physiologie de leur tube digestif, 3 mouches sont broyées entières dans 15 microlitres de solution PBS (Phosphate Buffer Saline). Un volume de 1.5 microlitres est utilisé pour mesurer l'absorbance du broyat à 594nm à l'aide d'un appareil *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). Un blanc est fait en utilisant des mouches du même génotype qui ont été nourries avec de la nourriture qui ne contient pas l'indicateur de pH. Les valeurs absolues d'absorbance sont

reportées sur un graphique. Le test de Kruskal-Wallis est pratiqué sur l'ensemble des données, puis un le test de Wilcoxon est pratiqué entre les conditions 2 à 2 pour voir quels sont les résultats qui sont statistiquement significativement différents entre eux.

2.11 Le test CAFE

Le test "Capillary Feeder" a été réalisé sur nos stocks de drosophiles par Christo Christov, dans l'équipe de Irene Miguel-Aliaga. Le procédé expérimental consiste à placer 24 drosophiles femelles de manière individuelle dans une plaque de 24 puits. La plaque est maintenue à 25°C. Chaque drosophile est nourrie via une micropipette, laquelle contient 5 microlitres de nourriture liquide. La pipette porte une graduation tous les millimètres, et 15 millimètres correspondent à 1 microlitre. La consommation des drosophiles est mesurée toutes les 24 heures, en notant la diminution de volume de nourriture restante dans la pipette. Une période de 24 heures d'adaptation est permise pour que les drosophiles s'habituent à la façon de se nourrir par la pipette. Après cette période, de nouvelles pipettes sont positionnées, et l'expérience débute. Après 24 heures, la consommation est enregistrée. Puis de nouvelles pipettes sont replacées pour les 24 prochaines heures, et ce processus se répète pendant une période de trois jours au total. La nourriture qui est contenue dans les pipettes contient 54g/L de saccharose et 36g/L d'extraits de levure, additionnée d'un antifongique (Nipagin) et d'un indicateur de pH (Bleu de Bromophénol) pour la rendre plus facilement visible. Les données qui sont exploitées sont les mesures, en millimètres, de quantité nourriture consommée par les drosophiles sur chaque période de 24 heures.

2.12 Analyse du transcriptome

L'analyse du transcriptome a été réalisée par la plate-forme Affymetrix de biologie moléculaire de l'institut Curie, à Paris, en utilisant des puces Affymetrix "Drosophila Genome" version 2.0. Les ARN totaux ont été purifiés à partir d'individus recolonisés ou axéniques, d'après le protocole présenté dans la section 2.4, page 23, en 3 réplicats pour chaque condition (3 groupes de 20 individus, avec une analyse transcriptomique pour chaque réplicat), à l'aide du Kit NucleoSpin RNA Clean-up de *Macherey-Nagel*. Les ARNs ont été envoyés à la plate-forme de l'institut Curie, et ils ont fait la production des ADN complémentaires eux-même. Les données brutes issues de leur travail ont été normalisées par la méthode du GC-RMA par leur soins, puis analysées par Pascal Rihet et Denis Puthier, du laboratoire TAGC⁶. Avant d'envoyer les échantillons à l'institut Curie, les niveaux d'expression de quelques gènes impliqués dans l'immunité dont le comportement est connu dans les différentes conditions biologiques testées ont été mesurés par des réactions de polymérisation en chaîne quantitative afin de vérifier qu'ils correspondaient à ce qui était attendu. Les charges bactériennes des drosophiles qui ont été utilisées pour cette expérience ont aussi été vérifiées selon le protocole présenté dans la section 2.5, page 24.

Les intestins moyens ont été disséqués dans du PBS froid (maintenu dans la glace) par groupes de 4 et placés dans un tube de 1.5 millilitres dans de la carboglace. Après avoir collecté 20 intestins moyens, le tube était stocké dans un incubateur à -80°C jusqu'au jour de l'extraction des ARN.

Les données brutes ont été analysées dans l'environnement R [224] par la méthode de l'ANOVA et par la méthode SAM (Significance Analysis of Microarrays) fournie par la librairie *siggenes* [200], en ayant fixé le taux de faux positifs (FDR : False Discovery Rate) à 20%. Je peux donc

6. Laboratoire TAGC / INSERM U1090, Avancées Technologiques en Génomique et en Clinique, Parc Scientifique de Luminy case 928, 163 avenue de Luminy, MARSEILLE cedex 09, 13288 France

m'attendre à une proportion de faux positifs d'environ 20%. Les analyses faites par l'outil informatique DAVID sur les listes de gènes pour détecter un enrichissement en terme de Gene Ontology comportent des tests statistiques, et seuls les résultats les plus significatifs sont retenus : après correction par la méthode de Benjamini-Hochberg [19], les termes qui ont une p-value supérieure à 0.01 ne sont pas considérés. Les analyses dans DAVID ont été faite en utilisant les noms des amorces de la puce Affymetrix, et l'ensemble des noms de toutes les amorces présentes sur la puce a été utilisé comme source pour calculer les enrichissements. Les résultats sont présentés en annexe, dans la table 6.18, page 206.

2.13 Confirmation des données issues de l'analyse du transcriptome par Q-PCR

Les données issues de l'analyse du transcriptome de la drosophile ont été confirmées en partie par une méthode indépendante, sur une série d'échantillons indépendante. Les échantillons utilisés pour la validation ont été produits de la même façon que ceux initialement utilisés pour les puces à ADN, à la différence près que l'extraction et la purification des ARN a été faite avec le kit "RNeasy Mini Kit" de *Qiagen*.

Des réactions de polymérisation en chaîne quantitative (Q-PCR) ont été menées sur les 10% de candidats les plus fortement dérégulés de chaque liste de gènes (voir table 4.9, page 105). Les réactions de Q-PCR ont été exécutées sur une machine CFX 96 de *BioRad* équipée d'un thermocycleur C1000 et avec le logiciel *BioRad* CFX Manager v2.0. Le mix réactionnel était préparé avec la solution SYBRGreenER de *Invitrogen*, en utilisant 3 microlitres de solution d'ADN complémentaire dans un volume réactionnel final de 15 microlitres. Le programme du thermocycleur est le suivant : (1) 8min 30sec à 94°C; (2) 40 cycles composés de 15sec à 94°C, 15sec à 60°C, 30sec à 72°C. Les données sont analysées selon la méthode du $\Delta\Delta C_t$, avec le gène RP49 (*rpl32*)⁷ comme référence interne à chaque échantillon.

Les données de l'analyse informatique effectuée avec le logiciel CisTargetX par Delphine Potier⁸ ont été confirmées en ce qui concerne le rôle du facteur de transcription Relish sur la liste de gènes induits dans l'intestin en présence de la mutation *pims^{Ey}* en utilisant des femelles doubles mutantes *yw;pims^{Ey};relish*. Ces individus ont été traités de la même façon que les autres échantillons utilisés dans cette étude. L'expression des 10% de gènes les plus dérégulés de la liste a été vérifiée chez le double mutant, et l'absence d'induction est considérée comme une validation du rôle du facteur de transcription Relish dans la régulation de l'expression du gène considéré.

7. Amorce Sens : 5'-GAC GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG-3'; Amorce Antisens : 5'-AAA CGC GGT TCT GCA TGA-3'

8. Stein Aerts Laboratory of Computational Biology, Department of Human Genetics, KULeuven, Herestraat 49, PO Box 602, 3000 LEUVEN, Belgium

Chapitre 3

Infection

3.1 Introduction

A l'époque où je démarrais mon doctorat, en octobre 2008, nous connaissions un nombre important d'activités biologiques potentielles des cellules circulantes de la drosophile. Ces cellules ont été décrites pour leur implication au cours du développement, et lors de réactions immunitaires. En effet, elles sont capables de produire et sécréter des peptides antimicrobiens, des cytokines, des espèces réactives à l'oxygène, des facteurs de coagulation et des protéines constitutantes de la matrice extra cellulaire. Elles sont aussi capables de faire la phagocytose pour éliminer les débris de cellules mortes par apoptose ou des bactéries [135, 246]. Cependant, beaucoup des travaux qui ont été menés ont été réalisés *ex vivo*, et relativement peu d'études visant à étudier le rôle des hémocytes avaient été conduites *in vivo*.

Il est communément admis que ces cellules, aussi appelées hémocytes, jouent un rôle d'éboueur au cours du développement, en éliminant par phagocytose les débris cellulaires des cellules détruites par apoptose. En effet, tout au long de la vie de l'organisme, et en particulier au cours du développement pupal, une grande quantité de cellules larvaires sont détruites et laissent leur place aux structures adultes en cours de développement. Les cellules circulantes, de par leur capacité de phagocytose, joueraient alors un rôle essentiel dans l'élimination des débris cellulaires issus de l'apoptose des cellules larvaires.

Il a été suggéré que les hémocytes jouent un rôle immunitaire en sécrétant des peptides antimicrobiens et des cytokines. Des études ont également indiqué que les hémocytes interviennent dans la réponse aux infections systémiques en phagocytant les microbes [11, 70]. Nous avons voulu approfondir ces travaux pour continuer d'étudier l'impact fonctionnel des cellules circulantes dans la réponse aux infections bactériennes systémiques chez l'adulte. Afin d'atteindre cet objectif, la stratégie originale que nous avons mise au point puis exploitée est d'éliminer les cellules circulantes dans les drosophiles en provoquant leur mort par sur expression d'un gène pro apoptotique de manière tissue spécifique, puis d'analyser la capacité de résistance à des infections bactériennes systémiques des individus dépourvus d'hémocytes, appelés Hemoless.

3.2 Résultats

La majeure partie des résultats obtenus par l'utilisation de ces drosophiles dépourvues d'hémocytes ont été publiés dans la revue *Journal of Innate Immunity* en 2009. Ces résultats sont présentés sous la forme d'une inclusion de l'article dans la section suivante. Cette publication est

le fruit d'un travail collaboratif, et je tiens à préciser ici que les figures 1 et 2b sont issues des contributions de Iwan Evans et Will Wood d'une part (Figure 1) et de Michèle Crozatier d'autre part (Figure 2b).

Les travaux présentés dans cet article ont ouvert des perspectives que nous avons explorées après la publication. Ces travaux complémentaires ont été menés pour étudier plus avant les mécanismes sous-jacents au rôle des hémocytes dans l'immunité (section 3.2.2, page 49), et leur impact dans la vitalité de l'animal (section 3.2.3, page 57).

3.2.1 Résultats publiés

3.2.1.1 Inclusion de l'article 1

Genetic Ablation of *Drosophila* Phagocytes Reveals Their Contribution to Both Development and Resistance to Bacterial Infection

Arnaud Defaye^{a, d} Iwan Evans^b Michèle Crozatier^c Will Wood^b
Bruno Lemaitre^{a, e} François Leulier^a

^aCentre de Génétique Moléculaire, CNRS FRE 3144, Gif sur Yvette, France; ^bDepartment of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, UK; ^cCentre de Biologie du Développement, UMR 5547 and IFR 109, CNRS and Université Paul Sabatier, Toulouse III, Toulouse, and ^dInstitut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy, CNRS UMR 6216, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, Marseille, France; ^eGlobal Health Institute, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland

Key Words

Haemocytes • Phagocytes • *Drosophila* • Invertebrate immunity

Abstract

Drosophila phagocytes participate in development and immune responses through their abilities to perform phagocytosis and/or secrete extra-cellular matrix components, antimicrobial peptides, clotting factors and signalling molecules. However, our knowledge of their functional impact on development and host resistance to infection is limited. To address this, we have used a genetic cell ablation strategy to generate *Drosophila* individuals lacking functional phagocytes. Our results highlight the essential contribution of phagocytes to embryonic development including central nervous system morphogenesis. Phagocytes also ensure optimal viability during post-embryonic development through immune functions. The use of phagocyte-depleted flies reveals the contribution of phagocytes in the resistance of *Drosophila* adults upon systemic infections with specific bacteria. Phagocytes were not involved in the expression of antimicrobial peptides by the fat body indicating a clear separation between cellular and humoral immune responses at this stage. Finally, we confirm that phagocytosis is a critical effector mechanism of the cellular arm by demonstrating

that phagocytosis contributes to resistance to infection with *Staphylococcus aureus* in adults. Our results highlight the power of this cell ablation strategy to reveal the contribution of phagocytes to specific biological processes. We now provide a blueprint of phagocyte importance during both development and innate immune responses in *Drosophila*.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Introduction

In mammals, phagocytes of the blood cell lineage are essential components of the innate and adaptive immune systems and play a role in tissue homeostasis and embryogenesis [1]. Recent findings have revealed an important degree of conservation in the signalling pathways involved in the development and function of blood cells in vertebrates and various invertebrate phyla, including *Drosophila melanogaster* [2, 3]. *Drosophila* haemocytes, the insect blood cells, are now widely used to analyse in vivo cell migration and phagocytic processes [4, 5]. However, our knowledge of their functional impact on development and host resistance to infection is limited.

As in vertebrates, *Drosophila* blood cells development occurs in two phases. A first haematopoietic wave takes place during embryogenesis when a population of hae-

macrophages originate from the procephalic mesoderm, which will differentiate into either plasmatocytes or crystal cells [6–9]. Plasmatocytes, the *Drosophila* professional phagocytes, make up to 95% of all embryonic haemocytes. They are extremely long-lived and persist through the larval stages, some being still detected in adults [10]. These cells are highly migratory and ingest microorganisms as well as ‘altered-self’ particles such as apoptotic cell corpses by phagocytosis [4, 5]. Therefore, they are referred to as phagocytes hereafter. A second population of haemocytes, the crystal cells, comprises up to 5% of embryonic haemocytes, persisting until the onset of metamorphosis and contribute to larval melanization reactions [11, 12]. A second wave of haematopoiesis occurs later, at the larval stages, in the lymph gland. The precursors of the lymph gland derive from the dorsal thoracic mesoderm and coalesce during embryogenesis to form the first paired lobes of the organ, which subsequently grow by cell proliferation during the first and second larval instars. By the late third instar larval stage, the lymph gland is the main site of haemocyte production in the animal, and the primary lobes can be divided into 3 structurally different zones: an outer cortical zone containing proliferating mature phagocytes and crystal cells, an inner medullary zone containing quiescent immature haemocytes, and a posterior signalling centre that acts as a niche [13–15]. The lymph gland is also the production site of a third type of haemocyte found only in larvae, the lamellocytes. Lamellocytes are large, adhesive cells devoted to the encapsulation of foreign bodies too large to be phagocytosed; these cells differentiate from the immature haemocyte pool only in response to specific conditions, such as parasitization of larvae by Hymenoptera [11]. Under normal conditions, the lymph gland phagocytes remain in the lymph gland throughout larval stages and enter the circulation only at the onset of metamorphosis and ingest doomed larval structures. At later stages, no haematopoietic organ is found. Consequently, all phagocytes present in the larval haemocoel are of embryonic origin while adult phagocytes, the only circulating cells at this stage, consist of a mixture of embryonic and lymph gland-derived phagocytes [10, 11].

Previous studies have revealed that *Drosophila* phagocytes participate in both development and immune responses [4, 16]. Indeed, they contribute to central nervous system (CNS) morphogenesis during embryonic development through clearance of apoptotic corpses and deposition of extracellular matrix components [17–19]. They also execute at least four immune tasks: (1) they secrete antimicrobial peptides [20, 21] and clotting factors

[22, 23]; (2) they engulf and digest micro-organisms through phagocytosis [5]; (3) they contribute to local and systemic tissue damage responses in larvae [24] and adults [25], and (4) they contribute, in larvae, to the systemic production of antimicrobial peptides by the fat body, the functional equivalent of the mammalian liver [26–28]. However, our knowledge of their functional impact on development and host resistance to infection is limited.

To test the functional importance of *Drosophila* phagocytes, we have generated animals depleted of phagocytes using a specific genetic cell ablation strategy and studied their development and capacity to resist infection. Our results strengthen the notion that *Drosophila* phagocytes contribute to development. They also reveal that phagocytes significantly contribute to host resistance to several bacterial infections in adults while being dispensable for humoral immune responses at this stage. Furthermore, we confirm that phagocytosis is an important effector mechanism of the cellular arm of *Drosophila* immune responses by demonstrating that phagocytosis contributes to host resistance to systemic *Staphylococcus aureus* infection in adults. Altogether, our analysis reveals the important contribution of *Drosophila* phagocytes to both development and immunity.

Experimental Procedures

Fly Stocks

Fly stocks and crosses were maintained on polenta-agar medium. To obtain *Haemo^{less}* embryos (embryos depleted of haemocytes), Bax was specifically expressed in all embryonic haemocytes by crossing UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP [29] males with *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA [30] virgin females at 29°C. GMA encodes the actin-binding domain of moesin fused to GFP. *Phago^{less}* larvae (*hml*(delta)GAL4, UAS-eGFP/UAS-*bax* larvae) and adults were obtained following crossing during 24 h at 25°C of virgin flies *hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP [31] with males UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP progenies were then switched to 29°C. Parental control UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP and *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA or sibling control *hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP and *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA/CyO-*actin*-GFP were used as appropriate. Conditional *Phago^{less}* animals were obtained by crossing virgin females *hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP with males UAS-*bax*,*Tub*-GAL80^{ts}/CyO-*actin*-GFP. The activity of the GAL4 system was controlled by placing the progenies either at restrictive temperature (29°C, GAL80 off, GAL4 system on) or at permissive temperature (18°C, GAL80 on, GAL4 system off). Germ-free *Phago^{less}* animals were obtained by crossing germ-free virgin females *hml*(delta)-GAL4, UAS-eGFP with germ-free males UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP on autoclaved standard medium. Germ-free parental stocks were generated by bleaching embryos and cultivating them on

autoclaved polenta-agar medium. *Relish*^{E20} (*Rel*^{E20}), *spätzle*^{rm7} (*spz*^{rm7}), *Df(3R)D605* and *Df(3R)Tl-I* fly strains were described previously [32, 33]. The *Tub-GAL80^{ts}* line was obtained from Bloomington Stock Center and recombined with UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP flies. The UAS-GFP-IR was provided by the National Institute of Genetics (Mishima, Japan) stock centre. The fly lines UAS-*Eater*-IR#1 (obtained from the Vienna RNAi stock centre, transformant ID 4301) targets the region 345–575 of the *Eater* ORF while the RNAi line UAS-*Eater*-IR#2 (obtained from the National Institute of Genetics) targets the region 27–525. No off-targets of these RNAi constructs were detected using a web-based search tool (<http://www.dkfz.de/signaling/tools.php>). 4- to 7-day-old adults flies were used in all experiments.

Viability Studies

Stage 14–17 *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA/UAS-*bax* (*Haemo*^{less}) or *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA (wild type) embryos laid and raised at 29°C on apple juice agar plates supplemented with yeast paste were counted and separated under a fluorescent dissection microscope and allowed to develop further at 29°C. Viability was scored by counting the number of larvae that hatched after 24 h and again at 48 h. Post-embryonic viability was assayed by comparing the number of *Phago*^{less} adults [*hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP/UAS-*bax*] and wild-type siblings [*hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP] derived from crosses between *hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP females and UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP males. Crosses were performed at 25°C and transferred at 29°C after 24 h. A 100% being arbitrary attributed to the number of emerging wild-type sibling controls.

Haemocyte Observation and Counts

hml(delta)-GAL4,UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP (wild type) and *hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP/UAS-*bax* (*Phago*^{less}) larvae or adults were anaesthetized and viewed under epifluorescent illumination (excitation filter 480 nm, dichroic filter 505 nm, emission filter 510 nm) with a Leica MZFLIII (Heerburg, Switzerland) dissecting microscope. Images were recorded with a charge-coupled device camera (Sony). For haemolymph observations, wild-type and *Phago*^{less} larvae were rinsed in sterile PBS, opened using forceps at the level of the posterior segment. Haemolymph samples were observed directly under a microscope (Leica DMRB) with either differential interference contrast or epifluorescent illumination. Circulating cells in wild-type and *Phago*^{less} larvae were counted per optical field using a haemocytometer under differential interference contrast illumination. Circulating cells expressing weak or strong GFP were counted in the same optical field under epifluorescent illumination. Acridine orange (AO) staining was used to reveal apoptotic corpses and acidic cell compartments. Haemocytes collected from wild-type and *Phago*^{less} larvae were incubated with 10 µl of 1.6 µM AO in PBS and observed under epifluorescent illumination.

Antibody Staining

serpent(hemo)-GAL4,UAS-GMA/UAS-*bax* (*Haemo*^{less}) and *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA/CyO-*actin*-GFP (wild type) embryos laid and raised at 29°C were fixed and co-immunostained. Rabbit anti-GFP (1/1,000; Abcam Inc.) was used to detect the presence or absence of the fluorescent balancer in combination with mouse anti-fascin (sn7c concentrate, diluted 1/100; Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB) to detect embry-

onic haemocytes (I. Evans and W. Wood, unpubl. data); BP102 mouse anti-CNS (supernatant diluted 1/100; DSHB) or mouse anti-fascin 2 (1D4 supernatant diluted 1/5; DSHB) were used in combination with anti-GFP to show CNS morphology. Primary antibodies were detected with FITC-conjugated goat anti-mouse (1/200; Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit (1/200; Molecular Probes). Immunostained embryos were visualized using a Leica LSM510 confocal microscope, and Z-stack projections were assembled using ImageJ.

Lymph glands from *hml*(delta)-GAL4,UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP (wild type) animals were dissected, fixed for 5 min in 4% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3), stained with primary rabbit polyclonal anti-GFP (1/1,000; Torrey Pines Biolabs) and TOPRO3 (Molecular Probes) to reveal nuclei, mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., US) and observed under confocal microscopy on a Zeiss LSM 510 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Bacterial Strains and Infection Experiments

Injuries were performed by pricking 4- to 7-day-old adult females in the lateral thoracic region with a thin needle either clean (washed and rinsed in 70% ethanol) or previously dipped into a concentrated pellet of the following bacteria. Flies were incubated at the indicated temperatures. *Erwinia carotovora carotovora* 15 (*Ecc15*): optical density (OD) at 600 nm = 170, 29°C; *Escherichia coli*: OD 160, 25°C; *Enterococcus faecalis*: OD 5, 25°C; *Bacillus subtilis*: OD 35, 29°C; *Staphylococcus saprophyticus*: OD 30, 25°C; *Streptococcus agalactiae*: OD 10, 25°C; *Enterobacter cloacae*: OD 100, 29°C; *Salmonella enterica* serovar typhimurium: OD 200, 29°C; *S. aureus*: OD 10, 25°C, or a mixture of *Micrococcus luteus* and *E. coli*: OD 100, 25°C. Peptidoglycan (PGN) preparations and injections were performed as previously described [32]. Survival analyses were performed on 20 adult females and repeated at least 3 times.

Quantitative Real-Time PCR

SYBR Green quantitative real-time PCR analysis was performed as previously described [32]. Primer information can be obtained upon request. The amount of mRNA detected was normalized to control *rp49* mRNA values. Normalized data were used to quantify the relative levels of a given mRNA according to cycling threshold analysis (ΔC_t). Relative $\Delta C_t^{\text{gene}}/\Delta C_t^{rp49}$ ratios of unchallenged wild-type controls were anchored in 1 to indicate fold induction. Graphs represent the mean and SD of relative ratios detected in 3 biological repetitions of a pool of 10 females.

Results

Drosophila Haemocytes Are Required for Embryonic Development

In order to reveal the functional importance of *Drosophila* haemocytes, we have used a genetic system to perform cell-specific ablation by promoting targeted ectopic cell death. This relies on the use of the yeast UAS/GAL4 binary system [34] to direct the expression of the murine

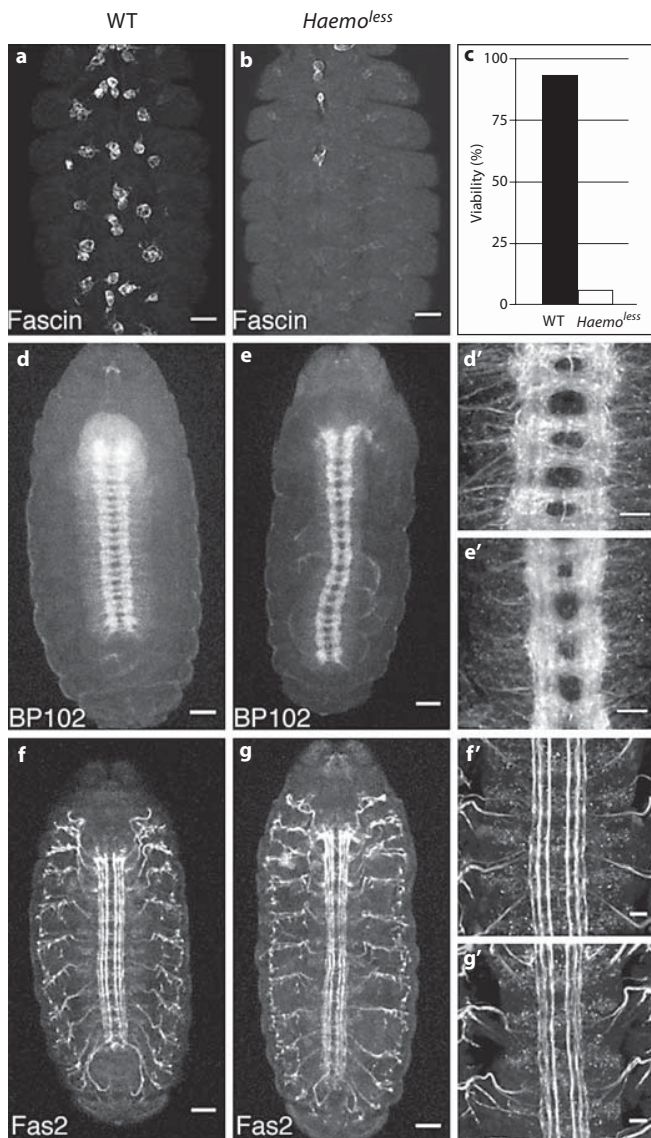


Fig. 1. *Drosophila* haemocytes contribute to embryonic development. **a, b** Anti-fascin staining of stage 14 wild-type (WT) and *Haemo^{less}* embryos reveals near complete ablation of embryonic haemocytes in *Haemo^{less}* embryos. Anti-fascin staining allows visualization of haemocytes. Scale bars = 20 μ m. **c** Developmental viability of wild-type (WT, $n = 150$) versus *Haemo^{less}* ($n = 162$) embryos expressed as the percentage of first instar larvae emerging from laid eggs. **d–g** BP102 staining (**d, e**) and fasciclin 2 (Fas2; **f, g**) staining of stage 17 wild-type and *Haemo^{less}* embryos reveal CNS condensation failure but otherwise grossly normal CNS architecture in *Haemo^{less}* embryos. Scale bars = 30 μ m. BP102 stains all CNS axons while fasciclin 2 stains longitudinal CNS axon tracts. **d'–g'** Enlargements of panels **d–g**. The anterior is up in all images. Genotypes: wild type: *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA/CyO-actin-GFP (**a, d, f**) or *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA (**c**); *Haemo^{less}*: *serpent*(hemo)-GAL4,UAS-GMA/UAS-*bax* (**b, e, g**).

bax gene. Bax is a potent pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, which promotes mitochondrial permeabilization [35] and efficiently triggers *Drosophila* apoptotic pathways [29]. Embryonic haemocyte identity is specified by the expression of the GATA factor *serpent*. *serpent* is required for specification of the haemocyte primordium within the head mesoderm at an early embryonic stage and, later, for adequate modification of the gene expression profile during haemocyte maturation [7]. To promote the ectopic death of most embryonic haemocytes, we drove the expression of a UAS-*bax* transgene using the *serpent*(hemo)-GAL4 driver. This driver is specific to all embryonic blood cell types and expresses from early haemocyte differentiation onwards [30]. *serpent*(hemo)-GAL4-mediated Bax expression led to almost complete deletion of embryonic haemocytes at stage 14 (fig. 1a, b). The lack of haemocytes was clearly associated with a strong lethality with only 6% of *Haemo^{less}* embryos ($n = 162$) reaching the first instar larval stage (fig. 1c). This strongly suggests that haemocytes are essential for normal embryonic development.

Previous studies had revealed that embryonic haemocytes promote CNS morphogenesis through clearance of apoptotic corpses and deposition of extracellular matrix components [17–19]. Therefore, we wondered if CNS morphogenesis was affected in *Haemo^{less}* embryos. During *Drosophila* embryogenesis, the ventral nerve cord (VNC) axons establish a precise pattern reiterated in each segment forming two longitudinal tracts that run the length of the embryo on either side of the midline, with a subset of these axons crossing the midline (fig. 1d, d'). During stage 16 and 17 of embryogenesis, the VNC undergoes a condensation phase along the antero-posterior axis. We observed that the VNC of *Haemo^{less}* embryos at stage 17 was longer and narrower than that of wild-type embryos (compare fig. 1e, g with fig. 1d, f). This indicates a failure of CNS condensation in these animals. Although CNS architecture was normal in *Haemo^{less}* embryos, the precise ladder-like axonal scaffold seen in wild-type embryos was disrupted leading to a rounding of the spaces between anterior and posterior commissures (fig. 1e, e'). Despite differences in axon scaffold shape, no inappropriate midline crossing of axons was detected (compare fig. 1f with fig. 1g). In wild-type animals, 3 major tracts of fasciclin-2-positive axons are observed near the dorsal surface of the CNS on either side of the midline (fig. 1f, f'). Three tracts of fasciclin-2-positive axons were also observed in *Haemo^{less}* embryos (fig. 1g, g'). Although these tracts were relatively normal, they did show very mild defasciculation in some segments (fig. 1g'). Alto-

gether, these results indicate that embryonic haemocytes are required for CNS morphogenesis.

Drosophila Phagocytes Are Essential for Optimal Viability during Post-Embryonic Development

Using the same strategy, we next addressed the functional impact of phagocytes during post-embryonic development. To overcome the essential requirement of haemocytes during embryonic development, we generated flies expressing Bax under the control of the *hml(delta)*-GAL4 driver. This transgene exclusively drives strong GAL4 expression in mature phagocytes from early first instar larval stage to adulthood [31] (fig. 2a, b, c', g, i, k, and data not shown). Of note, this driver expresses in both pools of phagocytes those of embryonic origin, which are sessile or in circulation in larvae (fig. 2a, c'), and those in the cortical zone of the lymph gland, which will populate adults (fig. 2b). *hml(delta)*-GAL4-mediated expression of Bax led to a massive disruption of the lymph gland during early larval stages (data not shown). The haemolymph of *hml(delta)*GAL4, UAS-eGFP/UAS-*bax* larvae (*Phago*^{less}) showed a large amount of apoptotic corpses, revealed by AO staining (fig. 2f, f') and a significantly reduced amount of circulating cells with an average of 74% decrease compared with wild-type larvae

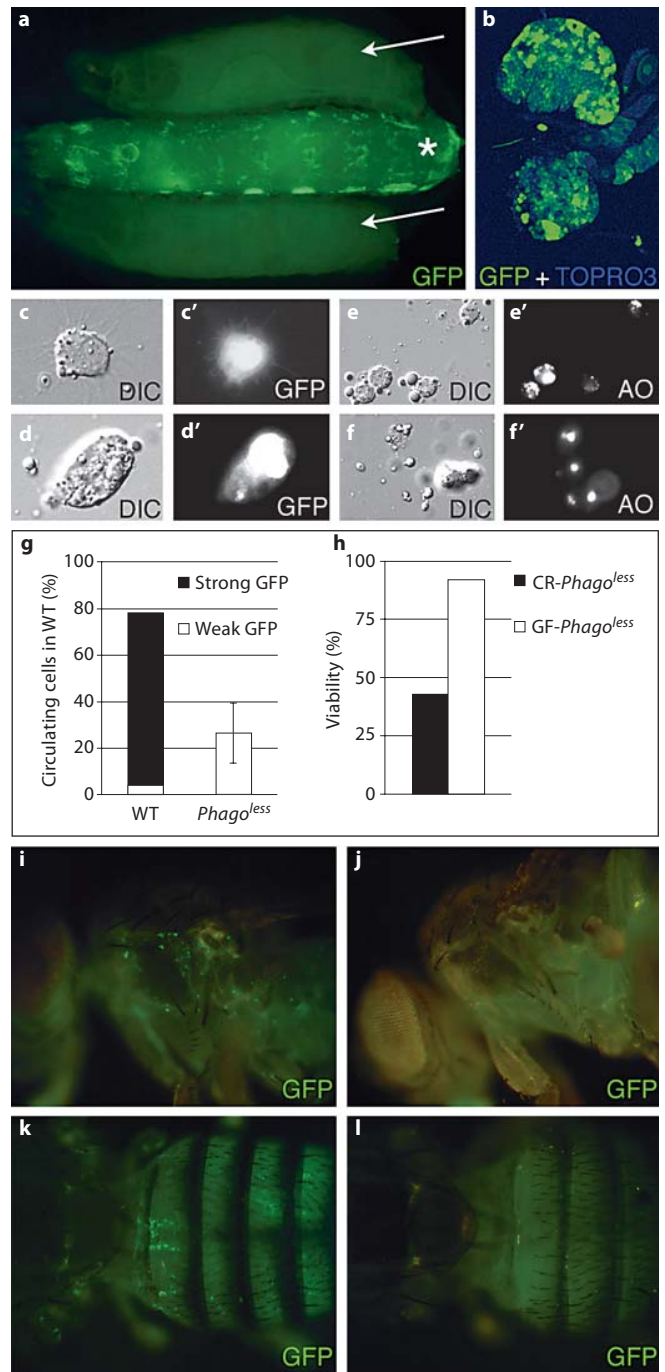


Fig. 2. *Drosophila* phagocytes are partially redundant for post-embryonic development. **a** Wild-type (asterisk) and *Phago*^{less} (arrows) wandering third instar larvae observed under epifluorescence illumination. Sessile and circulating larval phagocytes express the eGFP under the control of the *hml(delta)*-GAL4 driver. **b** Dissected lymph gland from *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/CyO-actin-GFP (wild type) third instar larvae stained with anti-GFP and TOPRO3 to reveal nuclei. *hml(delta)*-GAL4-positive phagocytes are observed in the cortical zone of the primary lobes. **c-f, c'-f'** Circulating haemocytes from wild-type (**c, c'** and **e, e'**) or *Phago*^{less} (**d, d'** and **f, f'**) larval haemolymph, non-treated (**c, c'** and **d, d'**) or stained with AO to reveal apoptotic corpses and acidic cellular compartments (**e, e'** and **f, f'**), observed under differential interference contrast (**c-f**) or epifluorescent illumination (**c'-f'**). **g** Quantifications of circulating cells per optical field showing weak (as in **d'**) or strong (as in **c'**) fluorescent signal under epifluorescence illumination in wild-type (WT) and *Phago*^{less} larvae expressed as the percentage of circulating cell number observed in wild-type larvae under differential interference contrast (DIC) illumination. **h** Relative developmental viability of *Phago*^{less} individuals raised under conventional (CR, n = 295) or germ-free (GF, n = 191) conditions at 29°C. Shown are the percentage of emerging adults compared with their respective wild-type siblings [*hml*-

(*delta*)-GAL4,UAS-eGFP/CyO-actin-GFP] anchored to 100%. **i-l** *Phago*^{less} adults (**j, l**) and sibling controls (**i, k**) observed under epifluorescence illumination. Lateral view of the thoracic region (**i, j**); dorsal view of the abdomen (**k, l**). Note the accumulation of sessile GFP-positive phagocytes on adult tissues (**i**) or circulating GFP-positive phagocytes along the dorsal vessel (**k**). Genotypes: wild type: *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/CyO-actin-GFP; *Phago*^{less}: *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/UAS-*bax*; siblings controls: *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/CyO-actin-GFP.

(fig. 2g). The remaining circulating cells appeared enlarged with an unusual morphology and lacked filipodia in sharp contrast to wild-type phagocytes (compare fig. 2c, e with fig. 2d, f). These enlarged cells weakly expressed the UAS-*gfp* transgene driven by the *hml(delta)*-GAL4 driver (fig. 2d', exposition time twice that of fig. 2c') and were unable to phagocytose AO-positive apoptotic corpses (fig. 2f'). In addition, phagosomal acidification, a key feature of phagosome maturation, which can be revealed by AO staining, did not occur in contrast to wild-type circulating phagocytes (fig. 2e', f'). Although the remaining circulating cells observed in *Phago^{less}* larvae may correspond to the previously identified population of undifferentiated circulating cells that are normally present in *Drosophila* larvae [11], we hypothesize that they rather correspond to a population of non-functional phagocytes at an early step of the apoptotic process or to abnormal lamellocytes released during the early rupture of the lymph gland. Nevertheless, these results indicate that efficient phagocyte ablation occurred during larval stages of developing *Phago^{less}* animals.

Remarkably, *Phago^{less}* adults were recovered and no *hml(delta)*-GAL4-positive circulating or sessile cells were observed through the cuticle (fig. 2j, l) or attached to dissected tissues (data not shown). In collected haemolymph, no circulating cell could be identified indicating that complete depletion of adult phagocytes occurred (data not shown). The recovery of viable and fertile adults deprived of phagocytes suggests that they are partially redundant for post-embryonic development to proceed. Indeed, they presented no obvious morphological defects apart from small melanotic masses found occasionally in the abdomen. However, phagocyte depletion still had a profound impact on developmental viability since, compared with wild-type siblings, 43% of the *Phago^{less}* animals reached adulthood when conventionally reared ($n = 295$; fig. 2h). This reduced viability may stem from a developmental function of phagocytes as suggested by previous reports showing that during metamorphosis, phagocytes ingest doomed larval tissues, in particular muscle cells [11]. Alternatively, phagocytes may ensure essential immune functions during larval stages to protect the host against opportunistic infections. To challenge these hypotheses, we generated germ-free *Phago^{less}* individuals and reared them under sterile condition. In this context, the developmental lethality of *Phago^{less}* animals was almost completely rescued to wild-type levels ($n = 191$; fig. 2h). Altogether, these results indicate that *Drosophila* phagocytes are dispensable for normal post-embryonic development to proceed. However they are

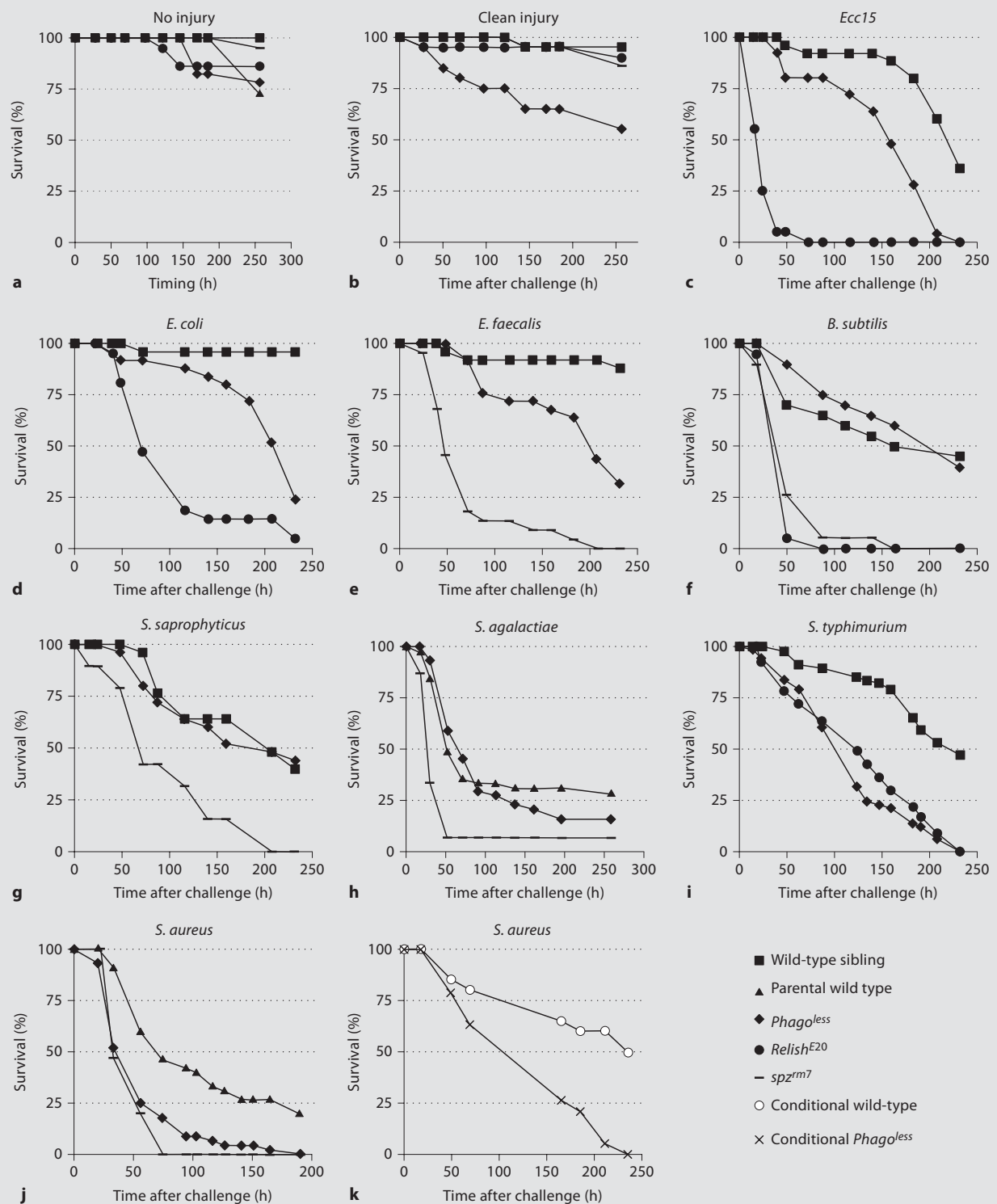
required for optimal viability during post-embryonic development probably through immune functions protecting the host to infection by environmental micro-organisms.

Reduced Resistance of *Phago^{less}* Adults to Bacterial Infections

Using *Phago^{less}* adults, we next addressed the functional impact of *Drosophila* phagocytes in adult fly resistance to bacterial infection. To this end, we used an established model of systemic bacterial infection by septic injury, which consists of wounding the adult thoracic cuticle with a needle previously dipped into a concentrated bacterial solution. In the past, this infection model had been successfully used to reveal the essential contribution of Toll and immune deficiency (Imd) signalling pathways in host resistance to systemic bacterial infection. Upon infection by different classes of micro-organisms, Toll and Imd pathways control the expression of particular sets of immune effector genes, including genes encoding antimicrobial peptides in the fat body [16]. As a consequence, Toll pathway mutants such as those affecting the *spz* gene present a striking susceptibility to systemic infection by several Gram-positive cocci while Imd pathway mutants such as those affecting the *Rel* gene show a dramatic susceptibility to systemic infection by several Gram-negative rods [16]. Therefore, we compared the resistance of *Phago^{less}* flies to wild-type flies and *spz* or *Rel* mutants after septic injury using various bacterial strains.

Phagocyte-depleted adults showed a slight reduction in resistance to clean wounding compared with wild-type flies or *Rel* and *spz* mutants (fig. 3b) while they behaved as wild-type, *spz* and *Rel* flies in absence of challenge during the course of our survival analysis (fig. 3a).

Fig. 3. Reduced resistance of *Phago^{less}* adults to bacterial infections. Survival analysis of *Phago^{less}*, wild-type siblings, wild-type parental control, conditional wild-type, conditional *Phago^{less}*, *Relish^{E20}* and *spz^{rm7}* flies in absence of injury (a), upon clean injury (b) or *Ecc15* (c), *E. coli* (d), *E. faecalis* (e), *B. subtilis* (f), *S. saprophyticus* (g), *S. agalactiae* (h), *S. typhimurium* (i) or *S. aureus* (j, k) septic injury. Twenty adult females were used per experiment, and a representative experiment out of a minimum of 3 repetitions is shown. Genotypes: *Phago^{less}*; *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/UAS-*bax*; wild-type sibling: *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP; parental wild type: UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP; conditional wild type: UAS-*bax*,*Tub*-GAL80^{ts}/CyO-*actin*-GFP; conditional *Phago^{less}*: *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/UAS-*bax*,*Tub*-GAL80^{ts}.



This observation correlates with a reported role for circulating cells in the fat body response to injury in adults [25] and their production of clotting factor [22, 23]. This observation suggests that adult phagocytes may also contribute to local responses to wounding, as observed in embryos [36, 37] and larvae [38, 39], probably by engulfing wound debris at the wound site and contributing to clot formation.

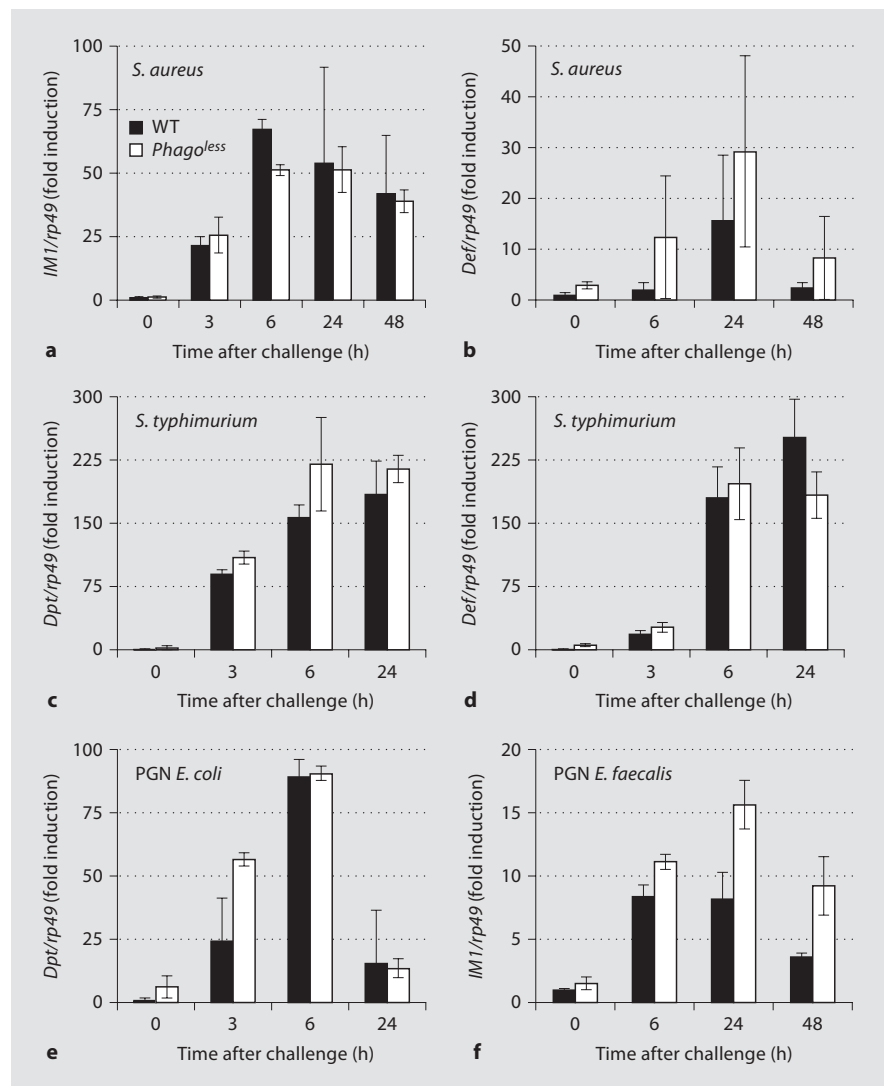
Compared with wild-type flies, *Phago^{less}* flies showed a late and mild increase in their susceptibility to systemic infections with the Gram-negative rods *Ecc15* (fig. 3c) and *E. coli* (fig. 3d) or the Gram-positive coccus *E. faecalis* (fig. 3e). This is in sharp contrast with *Rel* and *spz* mutants, which showed an acute and strong susceptibility to infection with these Gram-negative rods or Gram-positive cocci, respectively (fig. 3c–e). *Phago^{less}* adults resisted as wild-type animals to infection by the Gram-positive bacillus *B. subtilis* (fig. 3f), the Gram-positive cocci *S. saprophyticus* (fig. 3g) and *S. agalactiae* (fig. 3h) or the Gram-negative rod *E. cloacae* (data not shown). These results contrast with the strong susceptibility of Toll and/or Imd pathway mutant flies (fig. 3f–h, data not shown). In contrast, *Phago^{less}* animals were severely affected, compared with wild-type animals, in their resistance to systemic infection by the Gram-negative rod *S. typhimurium* or the Gram-positive coccus *S. aureus* (fig. 3i, j). Of note, upon infection by those germs, *Phago^{less}* flies exhibited the same level of susceptibility than Toll and Imd pathway mutants, respectively.

To test if the observed susceptibility to bacterial infection was directly associated with phagocyte ablation, we generated conditional *Phago^{less}* individuals using an additional ubiquitously expressed transgene encoding a thermosensitive version of the GAL4 inhibitor, GAL80 [40]. When reared at permissive temperature (18°C, GAL80 on, GAL4 system off) during the entire development, conditional *Phago^{less}* emerging adults had phagocytes and their developmental viability was similar to their wild-type siblings (95%, n = 55; data not shown). We then cultured them at restrictive temperature (29°C, GAL80 off, GAL4 system on) for 7 days. As observed with *Phago^{less}* escapers, conditional *Phago^{less}* adults were depleted of phagocytes (data not shown) and showed an increased susceptibility to *S. aureus* infection (fig. 3k). These results demonstrate that the susceptibility observed is indeed associated with adult phagocyte depletion and indicate that adult phagocytes contribute to the host survival to several bacterial infections and are important to resist *S. aureus* and *S. typhimurium* systemic infections.

The Humoral Antimicrobial Responses of Phago^{less} Animals Are Not Affected

Previous reports have suggested that the activation of Imd-mediated synthesis of antimicrobial peptides by the fat body of *Drosophila* larvae relies, at least partially, on the activity of haemocytes upon ingestion of the Gram-negative rod *Ecc15* [26, 27] or upon *E. coli* injection into the body cavity [28]. However, other reports suggest that phagocytes are not essential for this process [41, 42]. We wondered if the activation of the Toll or Imd pathway relies on phagocytes at the adult stage. To address this question, we monitored the expression of specific immune genes regulated either by the Toll pathway (*IM1*), the Imd pathway (*Diptericin*) or both pathways (*Defensin*) upon *S. aureus* and *S. typhimurium* infections in *Phago^{less}* adults. As observed in wild-type flies, both *IM1* and *Defensin* genes were significantly induced in *Phago^{less}* individuals upon *S. aureus* infection (fig. 4a, b). Similarly, both *Diptericin* and *Defensin* genes were strongly induced in *Phago^{less}* individuals as observed in wild-type animals upon *S. typhimurium* infection (fig. 4c, d). These results suggest that both Toll and Imd pathway activities upon infection with *S. aureus* and *S. typhimurium* are not affected by the absence of phagocytes. To further test this hypothesis, we assayed *Diptericin* and *IM1* expression in *Phago^{less}* individuals upon injection of purified DAP-type PGN (DAP-PGN) from Gram-negative rods (*E. coli*) or purified Lys-type PGN (Lys-PGN) from Gram-positive cocci (*E. faecalis*) that are potent elicitors of the Imd and Toll pathways, respectively [32]. Interestingly, both *Diptericin* and *IM1* genes were induced as in wild-type or even higher in *Phago^{less}* animals upon DAP-PGN and Lys-PGN injection, respectively (fig. 4e, f). Similar results were obtained when a mixture of *E. coli* and *M. luteus* bacteria was injected in wild-type and *Phago^{less}* adults (data not shown). Altogether, these results demonstrate that Imd and Toll pathway activities are normal in *Phago^{less}* animals and indicate that the increased susceptibility of *Phago^{less}* flies to *S. aureus* or *S. typhimurium* infections is not associated with a defect in the activation of Toll or Imd-dependent antimicrobial responses. Collectively, these results demonstrate that *Drosophila* adult humoral responses controlled by Toll and Imd signalling pathways are not significantly affected in the absence of phagocytes and support the notion that activation of the humoral arm of the *Drosophila* adult antimicrobial response does not rely on phagocyte activities.

Fig. 4. The humoral antimicrobial response of *Phago^{less}* animals is not affected. **a, b** Quantitative RT-qPCR analysis of *IM1* (**a**) and *Defensin* (*Def*; **b**) induction after *S. aureus* septic injury in wild-type and *Phago^{less}* adults. **c, d** Quantitative RT-qPCR analysis of *Diptericin* (*Dpt*; **c**) and *Defensin* (*Def*; **d**) induction after *S. typhimurium* septic injury in wild-type and *Phago^{less}* adults. **e, f** Quantitative RT-qPCR analysis of *Diptericin* (*Dpt*; **e**) and *IM1* (**f**) upon injection of purified DAP-PGN from *E. coli* or purified Lys-PGN from *E. faecalis* in wild-type and *Phago^{less}* adults. *rp49* was used as the experimental expression standard. Relative $\Delta C_t^{\text{gene}} / \Delta C_t^{rp49}$ ratios of unchallenged wild-type controls were anchored in 1 to indicate fold induction. Graphs represent the mean and SD of relative ratios detected in 3 biological repetitions of a pool of 10 females. Genotypes: wild type: *hml(delta)*-GAL4, UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP; *Phago^{less}*; *hml(delta)*-GAL4,UAS-eGFP/UAS-*bax*.



Phagocytosis Contributes to Drosophila Resistance to Bacterial Infection

In absence of any obvious defect in the activation of humoral immune responses, we wondered why *Phago^{less}* animals are less resistant than wild-type flies to *S. aureus* systemic infections. Of note, *S. aureus* is efficiently engulfed and digested by *Drosophila* phagocytes either ex vivo or in vivo [33]. Therefore, we hypothesized that phagocytosis may be an important resistance mechanism to *S. aureus* systemic infections in *Drosophila*. To test this hypothesis, we analysed the resistance to *S. aureus* infection of a *Drosophila* null mutant for *Eater*, a gene encoding a phagocytic receptor essential to mediate phagocytosis of *S. aureus* in vivo [33]. In addition, using

the inducible in vivo RNAi technique, we selectively knocked down *Eater* expression in phagocytes using two independent UAS-*Eater*-RNAi transgenes driven by the *hml(delta)*-GAL4 driver and assayed the resistance of these *Eater*-RNAi flies to *S. aureus* infection. Figure 5 shows that both *Eater* null mutant flies and flies where *Eater* expression was selectively knocked down in phagocytes presented an increased susceptibility to *S. aureus* infection compared with wild-type flies. Of note, silencing of *Eater* expression led to the same increase in susceptibility as in *Phago^{less}* animals. Therefore, these results demonstrate that phagocytosis is a predominant defence mechanism employed by *Drosophila* phagocytes to fight *S. aureus* systemic infections and suggest that the

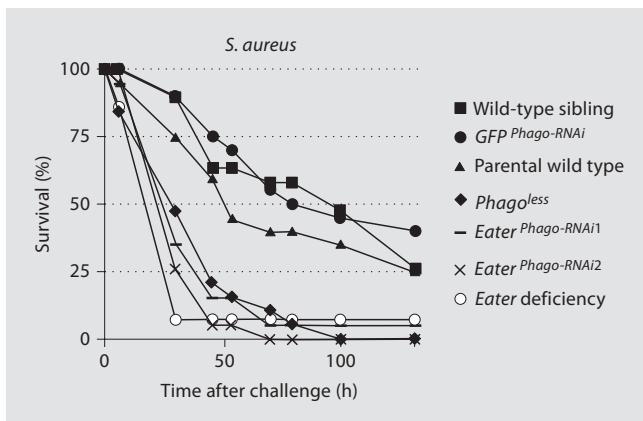


Fig. 5. Phagocytosis contributes to *Drosophila* resistance to systemic bacterial infection. Survival analysis of *Phago^{less}*, wild-type siblings, wild-type parental control, *GFP^{Phago-RNAi}*, *Eater^{Phago-RNAi1}*, *Eater^{Phago-RNAi2}* and *Eater* deficiency flies upon *S. aureus* septic injury. Genotypes: *Phago^{less}*: *hml(delta)*-GAL4, UAS-eGFP/UAS-*bax*; wild-type sibling: *hml(delta)*-GAL4, UAS-eGFP/CyO-*actin*-GFP; parental wild type: UAS-*bax*/CyO-*actin*-GFP; *GFP^{Phago-RNAi}*: *hml(delta)*-GAL4, UAS-eGFP/UAS-*GFP-IR*; *Eater^{Phago-RNAi1}*: *hml(delta)*-GAL4, UAS-eGFP/UAS-*Eater-IR#1*; *Eater^{Phago-RNAi2}*: *hml(delta)*-GAL4, UAS-eGFP/UAS-*Eater-IR#2*; *Eater* deficiency: *Df(3R)D605/Df(3R)Tl-I*.

enhanced susceptibility of *Phago^{less}* animals to *S. aureus* infection likely relies on the lack of this cellular defence mechanism.

Discussion

Based on their multiple developmental and immune functions, it has been inferred that *Drosophila* phagocytes play important roles during both development and immune responses. However, to our knowledge, no cell ablation experiments have ever been reported to confirm this. Here, we have challenged these ideas by generating *Drosophila* individuals lacking functional phagocytes. We now provide several lines of evidence supporting the essential requirement of haemocytes for embryonic development, the important contribution of larval phagocytes in host resistance to opportunistic infections during post-embryonic development and the critical role of adult phagocytes in the immune defence to several systemic bacterial infections.

Indeed, we have shown that specific ablation of *Drosophila* haemocytes leads to near complete lethality of the developing embryos indicating that haemocytes are es-

sential for embryonic viability. In addition, we confirm that haemocytes contribute to CNS morphogenesis, in particular to VNC condensation. Interestingly, the abnormal CNS morphogenesis phenotypes of *Haemo^{less}* embryos are reminiscent of those observed in mutants that disrupt either haemocyte production (*serpent*) or migration (*pvr*) [17, 18]. Similar phenotypes were also observed in embryos injected with *croquemort* dsRNA that impairs engulfment of apoptotic corpses by haemocytes [17] or when haemocytes express dsRNA of *SPARC*, a gene encoding a collagen binding extracellular matrix glycoprotein [19]. Collectively, our results and these observations demonstrate that haemocytes are essential for embryonic development most likely through their function of apoptotic corpse clearance and deposition of extracellular matrix components.

We also report that individuals depleted of phagocytes from early larval stages present a reduced developmental viability indicating that phagocytes ensure optimal survival during post-embryonic development. However, the emergence of viable and fertile *Phago^{less}* adults in proportion equivalent to wild-type siblings when reared in sterile conditions suggests that larval phagocytes are dispensable for normal post-embryonic development to proceed. Moreover, emerging germ-free *Phago^{less}* adults presented no obvious developmental delay or morphological defects apart from small melanotic masses found occasionally in the abdomen. Melanotic masses were also observed in animals reared under conventional condition and probably result from the encapsulation of incompletely eliminated larval tissues during metamorphosis. Indeed, it has been reported that *Drosophila* phagocytic cells participate in metamorphosis by ingesting doomed larval tissues, in particular muscle cells [11]. The fact that *Phago^{less}* larvae and pupae were perfectly viable when raised in axenic conditions indicates that larval phagocytes ensure important immune functions during post-embryonic development rather than performing developmental functions as observed in embryos. This is supported by the previous observation by Matova and Anderson [42], who reported that double mutants lacking the *Drosophila* Rel proteins Dif and Dorsal are often infected by opportunistic microbes and die from infection during larval stages. Specific expression of either Dif or Dorsal in the larval blood cell lineage was sufficient to clear microbes and allow partial survival to the adult stage. In addition, Braun et al. [41] observed that *domino* and *l(3)hem* mutant, which are devoid of functional blood cells contain numerous live micro-organisms in their haemocoel in contrast to wild-type larvae. Hence, our

results and these observations demonstrate that phagocytes significantly contribute to *Drosophila* larval viability in their standard laboratory environment, probably through clearance of opportunistic micro-organisms in the haemocoel.

Using adults depleted of phagocytes, we now demonstrate that these cells contribute to host resistance to systemic infections with specific bacteria. We observed that *Phago^{less}* individuals are as resistant as wild-type animals to *B. subtilis*, *S. saprophyticus*, *S. agalactiae* and *E. cloacae* infections while Toll or Imd pathway mutants present a striking enhanced susceptibility. This indicates that the cellular arm of *Drosophila* adult immune responses has either no role or is largely redundant against these germs. In contrast, Toll and Imd pathway-mediated immune responses play a key role. Nevertheless, the enhanced susceptibility of *Phago^{less}* animals to infections with *S. aureus* and *S. typhimurium* indicate that *Drosophila* phagocytes are critical players in the host resistance to these specific bacterial infections. The notion that phagocytes contribute to host resistance is further corroborated by the enhanced susceptibility of *Phago^{less}* flies to *Ecc15*, *E. coli* or *E. faecalis* infections compared with wild-type flies. In addition, the striking differences between the survival profiles of *Phago^{less}* animals and mutants affecting Toll and Imd pathways upon a large range of bacterial systemic infections indicate that the cellular and humoral antimicrobial defences have distinct and complementary functions in *Drosophila* adults. Recently, a report has suggested that the induction of the anti-bacterial peptide gene *Defensin* in the larval fat body during systemic infection requires blood cell contributions [28]. This points to a possible role of phagocytes in the activation of the antimicrobial peptide genes during systemic infection. This observation was controversial since previous studies did not reveal a role for phagocytes in this process at the larval stage [41, 42]. Here, we clearly show that in adults, phagocytes are dispensable for the activation of Toll and Imd-dependent antimicrobial responses upon systemic infection. This contrasts with oral infection models, where larval blood cells contribute at least partially to Imd pathway activation in the fat body upon ingestion of the Gram-negative bacteria *Erwinia carotovora* [26, 27] while adult phagocytes actually dampen Imd pathway activation in the fat body upon ingestion of the entomopathogenic bacterium *Serratia marcescens* [43].

Our results also indicate that phagocytosis is probably the main mechanism by which phagocytes contribute to resistance to systemic bacterial infection. Indeed, *Drosophila* null mutants for *Eater*, a gene encoding a phago-

cytic receptor essential to mediate phagocytosis of *S. aureus* in vivo [33], presented an increased susceptibility to *S. aureus* infection similar to *Phago^{less}* animals. This was also observed in flies where *Eater* expression was selectively knocked down by RNA interference in phagocytes. Interestingly, Toll and Imd pathway activities are not affected in *Eater* mutant flies upon systemic bacterial infection [33]. These observations demonstrate that phagocytosis contributes to resistance to systemic bacterial infection and acts as a complementary defence mechanism to antimicrobial humoral responses. This complementary role was suggested by a previous study that revealed the enhanced susceptibility to *E. coli* systemic infection of *Imd* mutant flies injected with polystyrene beads to saturate the phagocytic ability of adult phagocytes [44]. Finally, the importance of phagocytes upon systemic bacterial infection correlates with their critical role in host defence against oral infections by the entomopathogenic bacterium *S. marcescens* [33, 43].

Taken together, our observations indicate that the immune system of *Drosophila* adults relies on both the cellular and humoral defence mechanisms to resist systemic bacterial infections. However, the relative contribution of the cellular versus the humoral arm of its antimicrobial defence mechanisms appears to be highly dependent on the bacterial species. The contribution of phagocytes to host survival seems dependent on the specific virulence strategies employed by the infectious bacteria. Indeed, a clear contribution of phagocytes to host survival has so far only been revealed either when the humoral response was affected [44] or upon infection with pathogenic bacteria (*S. marcescens*, *S. aureus*, *S. typhimurium*) [this study and 33]. In contrast, the prevalence of Toll and/or Imd-mediated humoral responses for the host survival has been revealed upon all tested systemic bacterial infection, indicating a broader contribution of these humoral immune responses. Our study suggests that systemic infection by *S. typhimurium* or *S. aureus* are good infection models to study the molecular function of phagocytes in *Drosophila*.

In conclusion, we have now established a novel strategy to efficiently and selectively ablate phagocytes allowing the in vivo analysis of their contribution to specific biological processes in an invertebrate animal model, *D. melanogaster*. This completes previous phagocyte depletion strategies developed in vertebrates, which include suicide gene expression by macrophages in transgenic mice [45, 46] or the targeted disruption of the myeloid transcription factor *pu.1* expression in mouse or zebrafish [47, 48]. These strategies have been instrumental for

the appreciation of phagocyte functions in vertebrates but remained limited given the partial ablation generated or the developmental lethality induced [49, 50]. Using a selective and efficient phagocyte ablation strategy in *Drosophila*, we now provide a blueprint of phagocyte importance during both development and innate immune responses. Given the technical potential of the *Drosophila* model, our results pave the way to tissue-specific in vivo systematic genome-wide RNA interference screens to identify all genes important for phagocyte activities.

Acknowledgments

We thank Julien Royet for sharing unpublished data and his support to A.D., Isabelle Vallet-Gely for her critical reading of the manuscript, Bernard Mignotte, Bernard Mathey-Prevot, Katja Bruckner, Christine Kocks, the Bloomington stock center, the Vienna *Drosophila* RNAi Center and the National Institute of Genetics Fly Stock Centre for the fly lines, and Dominique Mengin-Lecreulx for the gift of purified peptidoglycan preparations. A.D. is funded by a doctoral fellowship from the French Research Ministry. W.W.'s lab is funded by a Wellcome Trust Career Development Fellowship. This work was supported by the French National Research Agency (ANR-05-MIIM-016-01, to B.L.) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (to B.L.).

References

- Gordon S: The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 2007;37(suppl 1): S9–S17.
- Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U: Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* 2003;5:673–690.
- Hartenstein V: Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:677–712.
- Wood W, Jacinto A: *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multi-tasking. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:542–551.
- Stuart LM, Ezekowitz RA: Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 2008;8:131–141.
- Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V: Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 1994;120:1829–1837.
- Rehorn KP, Thelen H, Michelson AM, Reuter R: A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* 1996;122:4023–4031.
- Lebestky T, Chang T, Hartenstein V, Banerjee U: Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 2000;288:146–149.
- Bataille L, Auge B, Ferjoux G, Haenlin M, Waltzer L: Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* 2005;132:4635–4644.
- Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R: The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 2003;130:4955–4962.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M: Post-embryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 2000;230:243–257.
- Bidla G, Dushay MS, Theopold U: Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci* 2007;120:1209–1215.
- Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U: The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 2005;132:2521–2533.
- Krzemien J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M: Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 2007;446:325–328.
- Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U: A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* 2007;446:320–324.
- Lemaitre B, Hoffmann J: The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007;25:697–743.
- Sears HC, Kennedy CJ, Garrity PA: Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* 2003;130:3557–3565.
- Olofsson B, Page DT: Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* 2005;279:233–243.
- Martinek N, Shahab J, Saathoff M, Ringuelette M: Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 2008;121:1671–1680.
- Samakovlis C, Kimbrell D, Kylsten P, Engstrom A, Hultmark D: The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J* 1990;9:2969–2976.
- Reichhart J, Meister M, Dimarcq J, Zachary D, Hoffmann J, Ruiz C, Richards G, Hoffmann J: Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterin promoter. *EMBO J* 1992;11:1469–1477.
- Goto A, Kadowaki T, Kitagawa Y: *Drosophila* hemocytin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol* 2003;264:582–591.
- Korayem AM, Fabbri M, Takahashi K, Scherfer C, Lindgren M, Schmidt O, Ueda R, Dushay MS, Theopold U: A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochem Mol Biol* 2004;34:1297–1304.
- Pastor-Pareja JC, Wu M, Xu T: An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 2008;1:144–154.
- Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey-Prevot B, Perrimon N: Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 2003;5:441–450.
- Basset A, Khush R, Braun A, Gardan L, Bocard F, Hoffmann J, Lemaitre B: The phytopathogenic bacteria, *Erwinia carotovora*, infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3376–3381.
- Dijkers PF, O'Farrell PH: *Drosophila* calcineurin promotes induction of innate immune responses. *Curr Biol* 2007;17:2087–2093.
- Brennan CA, Delaney JR, Schneider DS, Anderson KV: Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr Biol* 2007;17:67–72.
- Gaumer S, Guenal I, Brun S, Theodore L, Mignotte B: Bcl-2 and Bax mammalian regulators of apoptosis are functional in *Drosophila*. *Cell Death Diff* 2000;7:804–814.

- 30 Bruckner K, Kockel L, Duchek P, Luque CM, Rorth P, Perrimon N: The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Dev Cell* 2004;7:73–84.
- 31 Sinenko SA, Mathey-Prevot B: Increased expression of *Drosophila* tetraspanin, Tsp68c, suppresses the abnormal proliferation of γ -trifluoromethyl-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes. *Oncogene* 2004;23:9120–9128.
- 32 Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B: The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* 2003;4:478–484.
- 33 Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Ramet M, Ezekowitz RA: Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 2005;123:335–346.
- 34 Brand AH, Perrimon N: Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993;118:401–415.
- 35 Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322–1326.
- 36 Stramer B, Wood W, Galko MJ, Redd MJ, Jacinto A, Parkhurst SM, Martin P: Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol* 2005;168:567–573.
- 37 Wood W, Faria C, Jacinto A: Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 2006;173:405–416.
- 38 Galko MJ, Krasnow MA: Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* 2004;2:E239.
- 39 Babcock DT, Brock AR, Fish GS, Wang Y, Perrin L, Krasnow MA, Galko MJ: Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10017–10022.
- 40 McGuire SE, Mao Z, Davis RL: Spatiotemporal gene expression targeting with the target and gene-switch systems in *Drosophila*. *Sci STKE* 2004;2004:pl6.
- 41 Braun A, Hoffmann JA, Meister M: Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14337–14342.
- 42 Matova N, Anderson KV: Rel/NF- κ B double mutants reveal that cellular immunity is central to *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:16424–16429.
- 43 Nehme NT, Liegeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann JA, Ewbank JJ, Ferrandon D: A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* 2007;3:e173.
- 44 Elrod-Erickson M, Mishra S, Schneider D: Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* 2000;10:781–784.
- 45 Burnett SH, Kershen EJ, Zhang J, Zeng L, Straley SC, Kaplan AM, Cohen DA: Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J Leukoc Biol* 2004;75:612–623.
- 46 Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, Savill J, Hughes J, Lang RA: Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 2005;174:2336–2342.
- 47 McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA: Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 1996;15:5647–5658.
- 48 Clay H, Davis JM, Beery D, Huttenlocher A, Lyons SE, Ramakrishnan L: Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe* 2007;2:29–39.
- 49 Shepard JL, Zon LI: Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. *Curr Opin Hematol* 2000;7:3–8.
- 50 Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT, Kanki JP: Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell* 2005;8:97–108.

3.2.1.2 Discussion

Importance relative des hémocytes dans la résistance aux infections.

Le travail qui a été mené et publié dans l'article 1 démontre le rôle essentiel des hémocytes face aux infections systémiques par *S. aureus* ou *S. typhimurium* chez l'adulte. Il révèle également qu'ils ne sont pas requis de manière systématique pour résister à toutes les infections bactériennes systémiques. Au final, trois classes de phénotypes ont été observées ; dans la première les hémocytes ne sont pas requis, dans la seconde ils contribuent à la résistance à l'infection mais ne sont pas aussi importants que la réponse humorale médiée par les voies Toll ou IMD, et dans la troisième catégorie, ils sont absolument requis.

Face à *S. aureus*, nous avons confirmé l'importance du gène *eater*, impliqué dans la phagocytose du microbe, pour assurer la résistance à l'infection [123]. Il se peut que la phagocytose soit un mécanisme d'action systématique des hémocytes contre les bactéries, mais que la facilité avec laquelle les hémocytes phagocytent les bactéries soit variable selon l'espèce microbienne. Une partie des acteurs moléculaires de la phagocytose sont justement spécifiques à certains microbes [4, 182, 218], ce qui suppose des interactions spécifiques entre hémocytes et bactéries, selon les espèces. Nous savons en outre que la réponse humorale systémique, qui consiste à faire produire par le corps gras une grande quantité de peptides antimicrobiens et les sécréter dans l'hémolymphe, est essentielle à la survie de l'organisme, quelque soit l'espèce bactérienne rencontrée. Nous pouvons envisager que certaines bactéries soient plus sensibles que d'autres à l'action des peptides antimicrobiens [194, 22], et pour les plus sensibles la sécrétion de ces peptides serait suffisante pour les éliminer. Or, puisqu'il est clair que les hémocytes ne sont pas requis pour activer l'expression des gènes codant ces peptides (Article 1, Figure 4), cela pourrait expliquer le fait qu'il ne sont pas indispensables pour résister à certaines infections, probablement face aux bactéries les plus sensibles aux peptides antimicrobiens. Le temps d'exécution de la phagocytose est de l'ordre de la minute [11, 12, 70, 97, 126, 180, 182] alors que la dynamique d'expression des gènes codant les peptides antimicrobiens sous contrôle des voies de signalisation Toll et IMD est de l'ordre de l'heure (Table 1.2, page 9). Le besoin plus ou moins fort de l'animal vis-à-vis de la phagocytose des bactéries par les hémocytes dépend peut-être du niveau de virulence des microbes : si la virulence du microbe est supportable pour l'organisme durant la fenêtre de temps nécessaire à la production des peptides antimicrobiens, alors les hémocytes ne sont pas indispensables. Mais si le microbe est particulièrement virulent, alors les hémocytes, qui peuvent réagir rapidement, sont utiles pour garder le microbe sous contrôle en attendant la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Les cellules circulantes au cours du développement embryonnaire.

Nos collaborateurs ont observé que ces cellules sont indispensables au cours du développement embryonnaire pour assurer la mise en place du système nerveux, notamment la condensation de la chaîne nerveuse ventrale (Article 1, Figure 1). Cette observation fait écho aux travaux de Sears et al. [201], qui avaient montrés que l'activité de phagocytose des cellules circulantes est nécessaire pour assurer le bon déroulement de ces événements. On peut aussi imaginer que la bonne migration des cellules neurales repose sur la présence de la matrice extra cellulaire, or les hémocytes sécrètent plusieurs protéines qui la constituent, dont le collagène IV [77]. Une étude effectuée par Olofsson et al. [176] rapporte que l'absence des hémocytes a pour conséquence le manque de collagène IV dans la matrice extra cellulaire, et que le gène SPARC est requis dans les hémocytes pour permettre la sécrétion de cette protéine [147]. Il fut un temps considéré que cela pouvait contribuer au défaut de mise en place du système nerveux que nous avons observé, mais

les auteurs ont précisé plus tard que ce n'est pas le cas [147]. Pour tester l'hypothèse du besoin des protéines constitutives de la matrice extra cellulaire dans la mise en place du système nerveux, il faudrait inactiver dans les hémocytes les gènes codant ces molécules, et considérer si le développement de la chaîne nerveuse ventrale est affecté. Finalement, Evans et al. [72] démontrent que non seulement les hémocytes sont requis pour la mise en place correcte du système nerveux, mais que le bon développement de ce dernier est nécessaire pour permettre la migration effective des cellules circulantes dans l'embryon, et met ainsi en évidence un lien d'inter-dépendance entre le système nerveux et les hémocytes au cours du développement embryonnaire.

Les cellules circulantes au cours du développement post embryonnaire.

Après le stade embryonnaire, l'absence des hémocytes ne provoque pas de manière systématique la mort des drosophiles. Cependant, nous avons pu constater qu'ils assurent une meilleure survie au cours du développement via une fonction de protection immune face aux microbes de l'environnement (Article 1, figure 2h). En outre, au delà de fonctions immunitaires, des études récentes ont montré un rôle de ces cellules dans la réponse aux blessures [14, 81, 179] et dans le contrôle de la prolifération de cellules tumorales [60, 179].

Confirmation de nos résultats par des travaux indépendants.

Globalement, la pertinence de ces résultats démontre l'intérêt de l'approche mise en place, à savoir la déplétion des cellules circulantes chez la drosophile pour en étudier le rôle. Cette entreprise avait été initiée par Braun et al. [29] qui utilisait le mutant domino, chez qui on observe une grande diminution du nombre d'hémocytes. Mais aucune analyse n'avait pu être menée chez l'adulte car la mutation est létale au stade pré-pupal.

Par ailleurs, 2 autres équipes ont développé une approche similaire à la nôtre au même moment et ont publié des résultats en accord avec nos observations, confirmant ainsi leur validité de manière indépendante [44, 207]. Charroux et al. [44] utilisent le système UAS / GAL4 pour induire la sur expression du gène pro apoptotique *hid* dans les hémocytes, grâce au pilote Hml(Δ), et parvient à les éliminer efficacement. Shia et al. [207] utilise aussi le système UAS / GAL4 avec plusieurs pilotes (péroxidase : *pxn-GAL4*, serpent : *serpentD-GAL4*, ou hémolécine : *hml-GAL4*) et plusieurs gènes pro apoptotique (*UAS-ice*, *UAS-ced3* ou la combinaison *UAS-hid* avec *UAS-rpr*) et constate que la meilleure combinaison est *hml-GAL4, UAS-ice*. Deux mécanismes distincts permettent l'activation de l'apoptose : l'intégration de signaux extracellulaires (la voie dite "externe" de l'apoptose) ou l'activation par des signaux intracellulaires, impliquant la mitochondrie (voie dite "interne"). Nous avons utilisé le gène pro apoptotique murin *Bax*, qui déclenche l'apoptose par la voie interne, via le relargage de cytochrome C par la mitochondrie, et les deux autres études reposent sur l'activation de l'apoptose par la voie externe. Les deux stratégies se sont révélées efficaces.

Ces travaux confirment l'implication des hémocytes dans la résistance aux infections par *E. faecalis* [44, 207] et *E. coli* [207] et révèlent aussi leur importance dans la résistance à *C. albicans* et *P. entomophila* [44]. Charroux et al. confirment également que le corps gras peut activer chez l'adulte la synthèse des peptides antimicrobiens en absence d'hémocytes, et observe aussi le rôle de surveillance immunitaire lors du développement post embryonnaire en milieu non stérile.

Ces deux équipes ont principalement étudié l'impact de la perte des hémocytes chez la larve. Ainsi, outre les confirmations de nos propres observations chez l'adulte, elles ont produit des données supplémentaires, en particulier chez la larve. Il apparaît notamment que l'absence des hémocytes est corrélée à une colonisation plus importante de la cavité de l'animal par les bactéries

lors d'une infection systémique. En effet, en absence de cellules circulantes, les bactéries *E. faecalis* sont plus nombreuses dans le corps de la mouche [44] ; ce qui a été observé aussi chez la larve avec les bactéries *E. coli*, *Erwinia carotovora carotovora 15* (*Ecc15*) et *M. luteus* [207], confirmant un rôle des hémocytes dans la résistance aux infections bactériennes par l'élimination des bactéries. Par ailleurs, le travail rapporté par Nehme et al. [167] confirme à nouveau l'importance des hémocytes et du gène *eater* dans la résistance aux infections par *S. aureus*.

Dépendance de la réponse humorale larvaire à la présence des hémocytes.

Nous avons observé que la perte des hémocytes ne compromet pas la capacité des adultes à déclencher la transcription des gènes codant les peptides antimicrobiens, ce qui a été confirmé par Charroux et al. Or, chez la larve, les hémocytes sont requis pour activer la réponse humorale systémique lors d'une infection par ingestion de la bactérie à Gram négatif *Ecc15* [44, 207]. Les hémocytes assurent dans cette situation un rôle de transfert d'information entre le site de l'infection (l'intestin) et le corps gras, qui répond à l'information en sécrétant des peptides antimicrobiens dans l'hémolymph. Ce rôle est aussi observé lors d'infections systémiques par les bactéries *E. coli* ou *Ecc15* [207], et n'est donc pas restreint aux infections locales. Il a été proposé que l'oxide nitrique soit la molécule porteuse de ce signal, car elle est produite par les hémocytes et provoque la sécrétion des peptides antimicrobiens par le corps gras lorsque celui-ci la détecte [79]. Il a ensuite été démontré chez la larve que la sécrétion d'oxide nitrique par les hémocytes requière l'activité de l'enzyme calcineurine et que cette enzyme est nécessaire dans les hémocytes pour assurer la production de peptides antimicrobiens par le corps gras en réponse à l'infection intestinale [66]. Finalement, l'activation de la production de peptides antimicrobiens dans le corps gras suite à l'infection intestinale est rendue possible par la diminution de la quantité de protéine Jra, constituante du facteur de transcription AP-1 (un hétérodimère Jra/Kay), qui est un inhibiteur du facteur de transcription Relish [248].

De plus, il a aussi été observé que la production de peptides antimicrobiens par le corps gras en réponse à une infection systémique par une bactérie à Gram positif (*M. luteus*) chez la larve est diminuée par l'absence des hémocytes [207]. Shia et al. démontrent en effet qu'au cours d'une infection systémique par *M. luteus* les hémocytes sont nécessaires pour produire la cytokine Spätzle, activatrice de la voie de signalisation Toll. Si les hémocytes sont absents, ils ne produisent pas Spätzle et le corps gras ne produit pas de peptides antimicrobiens. Ce résultat confirme encore le rôle des hémocytes dans la signalisation au corps gras chez la larve pour assurer la production systémique de peptides antimicrobiens, lors d'infections par des bactéries à Gram positif et l'activation de la voie de signalisation Toll, comme par celles à Gram négatif pour l'activation de la voie IMD. Or ce phénomène n'a pas été observé chez l'adulte, il y a donc une différence fondamentale entre les systèmes larvaire et adulte et dans le rôle joué par les hémocytes à ces deux stades du cycle de vie de la drosophile. Cette différence s'explique probablement par les modes de vies très différents de la drosophile durant ces deux stades dans la nature : en effet elle est en contact permanent avec les microorganismes pendant les stades larvaires car elle se développe généralement sur des fruits en décomposition, c'est à dire dans un environnement très riche en microorganisme, et elle ne peut quitter l'endroit où elle se trouve alors que l'adulte peut se déplacer et éventuellement trouver une source de nourriture moins richement colonisée par les microbes. La larve aurait ainsi tendance à activer plus rapidement une réponse systémique que l'adulte, comme un mécanisme de prévention face à la forte présence de microbes dans son environnement.

Indépendance et complémentarité des réponses cellulaires et humorales chez l'adulte.

Chez l'adulte, la production de peptides antimicrobiens est indépendante de la présence des cellules circulantes. Or, les hémocytes participent à la résistance à certaines infections bactériennes. Nous pouvons nous interroger pour savoir si la perte combinée des cellules circulantes et de l'activité des voies Toll ou IMD provoquent une sensibilité plus forte aux infections que les simples mutants. Les résultats de Charroux et al. montrent que face à *E. faecalis*, le double mutant *spätzle* (voie Toll), Hemoless est plus sensible et meure plus rapidement que les simples mutants *spätzle* ou Hemoless. De même, Elrod-Erickson et al. [70] ont montré que le blocage de la phagocytose par injection de billes de polystyrène dans des mutants *relish* (voie IMD) provoque une sensibilité accrue à une infection par *E. coli* par rapport au simple mutant *relish* ou le blocage de la phagocytose seul. Il y a donc chez l'adulte une activité des hémocytes dans la résistance aux infections qui est indépendante et complémentaire de la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Conclusion.

Après avoir effectué ces premières expérimentations, nous avons décidé de poursuivre l'étude du rôle des hémocytes dans le but d'identifier des gènes dont la fonction est requise dans ces cellules pour en assurer la fonction de défense contre les infections systémiques. Nos résultats présentés dans l'article impliquent le récepteur de phagocytose Eater et suggèrent donc un rôle majeur de ce processus cellulaire dans la fonction biologique des hémocytes. Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude fonctionnelle d'un certain nombre de gènes potentiellement impliqués dans la phagocytose bactérienne, et je présente les résultats obtenus dans la section suivante. De plus, le fait que les hémocytes permettent une plus grande viabilité chez les larves en milieu non stérile nous a conduit à vérifier si cette fonction est conservée chez l'adulte. J'ai donc mesuré la longévité des individus Hemoless et contrôles, en milieu axénique et non axénique. Ces travaux sont présentés dans la section 3.2.3, page 57.

3.2.2 Crible de gènes candidats potentiellement impliqués dans la phagocytose

3.2.2.1 Introduction

Préambule.

Nous avons vu que le gène *eater* est requis dans les hémocytes pour assurer la survie des drosophiles adultes face aux infections systémiques par *S. aureus*, ce qui suggère que la phagocytose est une activité essentielle des hémocytes pour médier cette résistance. Nous avons également vu qu'il est possible d'éteindre l'expression d'un gène spécifiquement dans les cellules circulantes via l'utilisation du système UAS / GAL4, et de comparer la survie après infection des individus dont le gène cible est dérégulé dans les hémocytes à ceux qui sont dépourvus d'hémocytes (voir Article 1, Figure 5). Cette démarche ouvre des perspectives pour étudier les mécanismes sous-jacents à la résistance dépendante de la présence des hémocytes à une infection par *S. aureus* ou *S. typhimurium*. Nous pouvons envisager un crible génétique pour identifier les gènes dont l'expression est nécessaire dans les hémocytes pour assurer la résistance aux infections.

Les cribles génétiques pour identifier les gènes impliqués dans la phagocytose décrits dans la littérature.

Des cribles génétiques mis en place pour identifier les gènes nécessaires à la phagocytose chez la drosophile ont déjà été menés, mais ils étaient principalement basés sur l'utilisation de culture de cellules S2 [4, 18, 180, 182, 187, 218], sauf une étude *in vivo* ciblée sur les gènes codant les RhoGTPases [12]. Nous nous sommes proposé de conduire un crible destiné à identifier, parmi une sélection de gènes candidats, ceux dont l'expression est requise dans les hémocytes *in vivo* pour assurer la survie des adultes lors d'infections systémiques par *S. aureus* ou *S. typhimurium*, qui sont les deux bactéries contre lesquelles les hémocytes sont requis pour assurer la survie (Article 1, Figure 3). Le principe est de réduire l'expression du gène candidat par ARN interférence de manière tissu-spécifique dans les hémocytes via l'utilisation du système UAS / GAL4 avec le pilote *hml-GAL4* et de soumettre les mouches à une infection. Les individus Hemoless et des individus contrôles sont également soumis à l'infection. Si les mouches dans lesquelles le gène candidat est réprimé meurent aussi vite que les individus Hemoless, alors le gène est considéré comme impliqué dans les mécanismes qui permettent la résistance de l'animal à l'infection, *a priori* la phagocytose.

Les candidats pré sélectionnés pour notre crible.

Les gènes que nous avons pré sélectionnés pour ce crible sont issus des travaux publiés par d'autres équipes (voir paragraphe précédent) et peuvent être répartis en 6 groupes. Il y a des candidats de type Nimrod (ex : Nimrod C1, une protéine transmembranaire des hémocytes impliquée dans la phagocytose de bactéries [126]), les récepteurs de type éboueur (ex : Croquemort, décrit dans la phagocytose de débris de cellules mortes par apoptose [80]), les opsonines (ex : les gènes Tep, codant des protéines décrites comme capable de se fixer sur la surface de bactéries et facilitant peut-être ainsi leur phagocytose [127]), des acteurs de la voie de signalisation de l'Ecdysone (ex : EcdR, le récepteur à l'ecdysone, une hormone qui contrôle la durée du développement larvaire et active le système immunitaire au moment de la pupaison, et qui promeut l'activité de phagocytose de cellules en culture [67]), des protéines impliquées dans le cytosquelette (ex : WASP, un régulateur de la dynamique des filaments d'actine [180]) et quelques candidats supplémentaires, qui ne font pas partie d'une de ces catégories et qui sont rassemblés dans le groupe « Autres » (ex : Serpent, un facteur de transcription impliqué dans le développement des hémocytes [187]).

3.2.2.2 Résultats et discussion

La Table 1 indique les gènes candidats que nous avons soumis aux tests et les résultats obtenus. Elle contient également les références bibliographiques qui nous ont permis de choisir chacun de ces gènes comme candidats, et le nombre de tests effectués pour chaque gène. Un exemple de test positif et négatif est présenté dans la figure 3.1, page 56.

Gène	Lignée testée	<i>S.aureus</i>			<i>S.typhimurium</i>			Sources
		Tests	Lignée	Gène	Tests	Lignée	Gène	
Nimrods								
nimrod A	NimA VDRC	1	Neg	Neg				[126]
nimrod B1	NimB1 VDRC	1	Neg	Neg				[126]
nimrod B2	NimB2 R2	1	Neg	Neg				[126]
	NimB2 R3	1	Neg					
nimrod B5	NimB5 VDRC	1	Neg	Neg				[126]
	NimB5 R1	1	Neg					
nimrod C1	NimC1 IR	3	Neg	Neg				[97, 126]
nimrod C2	NimC2 R3	2	Neg	Neg	1	Pos	Pos	[126]
	NimC2 VDRC	1	Neg					
nimrod C3	NimC1 VDRC	2	Ind	Ind	1	Pos	Pos	[126]
nimrod C4	NimC4 R1	4	Neg	Pos	2	Pos	Pos	[126]
	NimC4 R2	5	Neg		3	Pos		
	NimC4 VDRC	1	Pos					
	NimC4 Null	3	Pos		3	Neg		
slowdown	7447 R1	2	Ind	Neg	1	Pos	Pos	[84]
	7447 R3	1	Neg					
	7447 VDRC	1	Neg					
draper	draper VDRC	1	Neg	Neg				[97, 126, 146]
eater	eater VDRC	6	Ind	Pos	3	Neg	Pos	[97, 123, 126]
	eater R1	3	Neg		1	Pos		
	eater R2	4	Pos		1	Pos		
	eater Null	5	Pos		2	Ind		
Récepteurs de type éboueur								
dSCAM ¹	dscam IR	2	Neg	Neg				[241]
croquemort	crq R1	1	Neg	Neg				[80]
	crq VDRC	1	Neg					
peste	7447 VDRC	1	Pos	Neg			Pos	[181]
	7447 R3	1	Neg					
	7447 R1	2	Neg		1	Pos		
emp ²	2727 R2	1	Neg	Neg				GO
	2727 R4	1	Neg					
CG1887	1887 VDRC	2	Neg	Neg	1	Pos	Pos	GO
CG2736	2736 VDRC	2	Ind	Ind	1	Pos	Pos	GO
santa maria	12789 R1	1	Neg	Neg			GO	
	12789 R3	1	Neg					
snmp1 ³	7000 R2	1	Neg	Neg				GO
	7000 R3	1	Neg					
CG2727	2727 R1	1	Neg	Neg				GO
	2727 R2	1	Neg					
CG10345	10345 VDRC	2	Neg	Neg	1	Pos	Pos	GO
CG3829	3829 R1	3	Pos	Ind	2	Neg	Neg	GO
	3829 R2	3	Neg		2	Ind		
dSR-CI ⁴	dSRC1 VDRC	2	Ind	Ind	1	Pos	Pos	[186]
dSR-CII	dSRC2 VDRC	3	Neg	Ind			Pos	[186]
	dSRC2 R1	2	Pos		1	Pos		

Continue sur la page suivante

1. drosophila down Syndrome Cell Adhesion Molecule
2. epithelial membrane protein
3. Sensory neuron membrane protein 1
4. drosophila Scavenger Receptor CI

TABLE 3.1 – suite de la page précédente

Gène	Lignée testée	<i>S. aureus</i>			<i>S. typhimurium</i>			Sources
		Tests	Lignée	Gène	Tests	Lignée	Gène	
dSR-CIII	dSRC3 VDRC	1	Neg	Neg				[186]
dSR-CIV	dSRC4 R1	1	Neg	Neg				[186]
Opsonines								
Tep I ⁵	Tep I VDRC	1	Neg	Neg	1	Pos	Pos	[26, 127, 160]
Tep II	18589 R1	1	Pos	Pos	1	Neg	Neg	[26, 218]
	18589 R2	1	Ind		1	Neg		
Tep III	Tep III VDRC	1	Neg	Neg	1	Pos	Pos	[127, 218]
	7968 R2	2	Ind					
	7968 R3	2	Neg					
Tep IV	Tep IV VDRC	1	Neg	Neg				[127]
mcr ⁶	mcr VDRC	1	Neg	Neg				[218]
LpR2 ⁷	4823 R2	2	Neg	Neg	1	Pos	Pos	[143]
Ecdysone								
EcdR ⁸	EcdR-DN ⁹	1	Neg	Neg				[67]
ftz-f1	ftz-f1 VDRC	2	Ind	Ind				
DHR3	DHR3 IR ¹⁰	2	Neg	Neg				
	DHR3 R3	2	Ind					
E75	E75 IR ¹¹	2	Ind	Neg				
	E75 VDRC	2	Neg					
Cytosquelette								
dWASP ¹²	WASP VDRC	2	Neg	Pos	1	Ind	Ind	[180]
	1520 R1	1	Pos		1	Pos		
	1520 R2	1	Pos		1	Neg		
SCAR	SCAR VDRC	1	Pos	Pos	1	Pos	Neg	[180, 218]
	SCAR R1	4	Pos		3	Neg		
	SCAR R2	4	Neg		3	Neg		
Autres								
iNOS ¹³	iNOS VDRC	2	Pos	Pos	1	Pos	Pos	
psidin	psidin VDRC	2	Ind	Ind	1	Neg	Neg	[30]
rac2	rac2 VDRC	4	Neg	Pos	3	Neg	Neg	[27]
	rac2 null	3	Pos		3	Ind		
β' -cop I ¹⁴	beta copI VDRC	1	Neg	Neg	1	Pos	Pos	[187]
serpent	srp VDRC	1	Neg	Neg	1	Neg	Neg	[187]
CG2556	2556 R1	1	Neg	Neg				
CG5730	5730 VDRC	2	Neg	Neg	1	Neg	Neg	

TABLE 3.1 – Résultats du crible génétique mené pour identifier les gènes dont l'expression est requise dans les hémocytes pour assurer la survie aux infections systémiques par *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella typhimurium*.

-
5. Thioster containing protein I
 6. macroglobulin complement related
 7. Lipophorin Receptor 2
 8. Ecdysone Receptor
 9. UAS-Ecdr-DN : exprime une version Dominante Négative du gène
 10. Fourni par Jacques Montagne
 11. Fourni par Hervé Tricoire
 12. Wiskott-Aldrich syndrome protein
 13. inducible Nitric Oxide Synthase
 14. β' -coatomer protein I

La colonne « gène » Indique les catégories de gènes et le nom de chaque gène. La colonne « Lignée » indique pour chaque gène quelle lignée ARNi a été utilisée. Les deux grandes colonnes « *S. aureus* » et « *S. typhimurium* » présentent les informations relatives aux tests effectués en utilisant les bactéries *S. aureus* ou *S. typhimurium*, respectivement. A l'intérieur de ces grandes colonnes, la colonne « Tests » indique le nombre de fois que la lignée ARNi considérée a été testée. La colonne « Lignée » indique pour la lignée ARNi considérée la conclusion tirée à partir des résultats obtenus des différents tests. Le résultat est « Pos » (positif) si la lignée a montré un phénotype de sensibilité à l'infection, et « Neg » (négatif) dans le cas contraire. Si sur un nombre pair de tests, la lignée a montré une sensibilité pour la moitié d'entre eux et pas de sensibilité pour l'autre moitié, alors le résultat enregistré est « Indéterminé », ce qui indique qu'il faut reproduire encore des tests pour conclure. La colonne « Gène » renseigne, pour le gène considéré, la conclusion tirée à partir des résultats des différentes lignées. Si il y a plusieurs lignées ARNi testées, mais que les conclusions propres à chacune sont en opposition (par exemple dans le cas de 2 lignées : « Pos » pour l'une d'entre elles et « Neg » pour l'autre) alors le résultat enregistré pour le gène est « Ind » (Indéterminé). Enfin, la colonne « Source » indique les références bibliographiques qui nous ont permis de choisir ces candidats, « GO » signifie que le gène possède le terme de Fonction Moléculaire « scavenger receptor » (Récepteur de type éboueur) de Gene Ontologie qui lui est associé (d'après le site FlyBase¹⁵). Pour les cas où nous disposons à la fois des lignées ARNi et d'un mutant de perte de fonction, les résultats obtenus avec le mutant prime sur ceux obtenus avec les lignées ARNi (*Nimrod C4*, *eater*, *Rac2*).

Considérations générales.

Sur les 45 gènes testés, tous ont été soumis à une infection par *S. aureus* et 24 ont été testés face à *S. typhimurium*. Face à *S. aureus*, 7 gènes sont retenus comme ayant montré un phénotype de sensibilité, 31 n'ont pas montré de sensibilité accrue, et 7 présentent des résultats ambigus. Face à *S. typhimurium*, 15 gènes sont retenus comme ayant montré un phénotype de sensibilité, 8 ne présentent pas de sensibilité, et le profil de 1 gène est ambigu. Que ce soit pour *S. aureus* ou *S. typhimurium*, les gènes qui ont un profil ambigu doivent être soumis à nouveau au même test pour nous permettre de conclure. Il faut préciser que ces données doivent être considérées comme préliminaires, puisque le nombre de tests effectués est petit pour beaucoup de gènes. Pour la majorité d'entre eux il faut donc confirmer les résultats obtenus en répétant ces mêmes expériences plusieurs fois, et s'assurer que l'expression du gène cible est effectivement diminuée par le système d'ARN interférence. Néanmoins nous pouvons déjà commenter ces résultats par rapport à ce que d'autres équipes ont rapporté.

Réponse à *S. aureus*.

Nimrods. Les résultats obtenus pour Nimrod C1 par Kurucz-Ando et al. [126] ont montré que ce gène est requis pour la phagocytose de *S. aureus* par les hémocytes larvaires *ex vivo*, et nos résultats vont dans le sens d'une nécessité de Nimrod C1 pour phagocyter *S. aureus in vivo*. Hashimoto et al. [97] ont montré que draper est requis pour la phagocytose de *S. aureus*, et la survie des mouches lors d'une infection systémique par cette bactérie. Nos résultats n'ont pas permis de confirmer cette observation, mais doivent être confirmés. Kocks et al. [123] ont montré que le gène *eater* est requis dans les hémocytes pour la phagocytose de *S. aureus* chez l'adulte, *in vivo*. Encore une fois, nos résultats confirment que ce gène est requis dans ces cellules pour assurer la résistance à cette infection.

Récepteurs de type éboueur. Watson et al. [241] ont révélé que le gène *dscam* est impliqué dans les hémocytes larvaires pour la phagocytose *in vivo* de *E. coli*. Face à *S. aureus*, nous n'avons pas vu de phénotype de sensibilité chez l'adulte lorsque les hémocytes activent l'ARN interférence contre ce gène. Franc et al. [80] ont montré *in vivo* chez l'embryon de drosophile que croquemort est requis pour la phagocytose de particules issues de cellules mortes par apoptose mais n'est pas requis pour la phagocytose des bactéries *E. coli* ou *S. aureus*. Nous observons la même chose pour

15. <http://flybase.org/>

S. aureus chez la drosophile adulte. Philips et al. [182] avaient montré que peste est requis pour la phagocytose par des cellules S2 des Mycobacteria et Listeria, mais pas pour *S. aureus* ni *E. coli*. Nos propres résultats indiquent que ce gène ne semble pas être requis pour la phagocytose de *S. aureus in vivo*. Ramet et al. [186] ont montré que dSR-CI est requis pour la phagocytose de *S. aureus* et *E. coli*. Nous n'avons pas obtenu de résultat clair avec ce candidat pour *S. aureus*, mais il semble qu'il soit impliqué dans la résistance aux infections par *S. typhimurium*. Cependant, nous n'avons effectué que 2 tests pour *S. aureus* et 1 pour *S. typhimurium* et devrions donc en reproduire pour conclure.

Opsonines. Stroschein-Stevenson et al. [218] ont effectué un crible génétique basé sur l'utilisation du système ARN interférence pour identifier des gènes nécessaires à la phagocytose de *C. albicans* par des cellules S2 en culture. Ils rapportent que le gène *mcr* (macroglubulin complement related) est requis pour la phagocytose de *C. albicans* par les cellules S2. Nous n'avons pas observé qu'il soit nécessaire d'exprimer ce gène dans les hémocytes chez l'adulte pour phagocyter *S. aureus*. Ils montrent aussi que Tep II n'est pas requis pour la phagocytose de *S. aureus*, mais que Tep III est requis. Or, nos résultats sont conflictuels avec ces observations. Nous ne voyons pas la nécessité de Tep III dans la résistance aux infections par *S. aureus*. En ce qui concerne Tep II, il faudrait augmenter le nombre de tests pour affiner nos observations afin de voir si elles se confirment. Tep I favorise la phagocytose de *E. coli* et *S. aureus* par le moustique *Anopheles gambiae in vivo* [160], et semble intervenir chez la drosophile dans la phagocytose de *S. typhimurium*, mais pas de *S. aureus*.

Ecdysone. Dimarcq et al. [67] ont observé en culture de cellules que l'ecdysone augmente la capacité à phagocyter des levures. Entre nos mains, le récepteur à l'ecdysone, EcdR, ne semble pas requis pour résister aux infections par *S. aureus*.

Cytosquelette. Pearson et al. [180] rapportent que les gènes WASP et SCAR sont requis pour une phagocytose efficace de *S. aureus* par des cellules S2 en culture, et WASP l'est aussi pour la phagocytose de la même bactérie par les hémocytes larvaires *ex vivo*. Nos résultats suggèrent un rôle de ces deux gènes dans les hémocytes pour la phagocytose *in vivo* de *S. aureus*.

Autres. Rac2 est impliqué dans la phagocytose chez les mammifères [27]. Chez la drosophile il est requis pour garantir la survie à diverses infections bactériennes systémiques chez l'adulte [12], et pour la phagocytose de *E. coli* [12] et *S. aureus* [12, 97, 197] par les hémocytes larvaires *ex vivo*. Nous confirmons que ce gène est nécessaire pour résister aux infections systémiques par *S. aureus* chez la drosophile. Psidin est requis *in vivo* pour la dégradation de *E. coli* une fois que la bactérie est à l'intérieur de l'hémocyte [31]. Mais psidin ne semble pas requis pour résister aux infections par *S. typhimurium*, et ce n'est pas clair pour *S. aureus*. Il est nécessaire de reproduire ces tests. Serpent et β '-COP I ont été décrits comme impliqués dans la phagocytose de *S. aureus* et *E. coli* en culture de cellules [187] mais nous n'avons observé une sensibilité accrue dans notre crible *in vivo* que pour β '-COP I face à *S. typhimurium*. Cependant, il faut répéter ces tests pour pouvoir conclure.

Réponse à *S. typhimurium*.

En ce qui concerne les tests effectués avec *S. typhimurium*, de nombreux candidats sont retenus comme ayant montré un résultat positif et sont à confirmer par des tests supplémentaires, afin d'avoir un nombre de tests suffisant. Il est remarquable que cette bactérie n'est jamais été utilisée lors de cribles effectués par d'autres équipes [187, 180, 4, 182, 18, 218], ce qui confère un caractère original à notre travail.

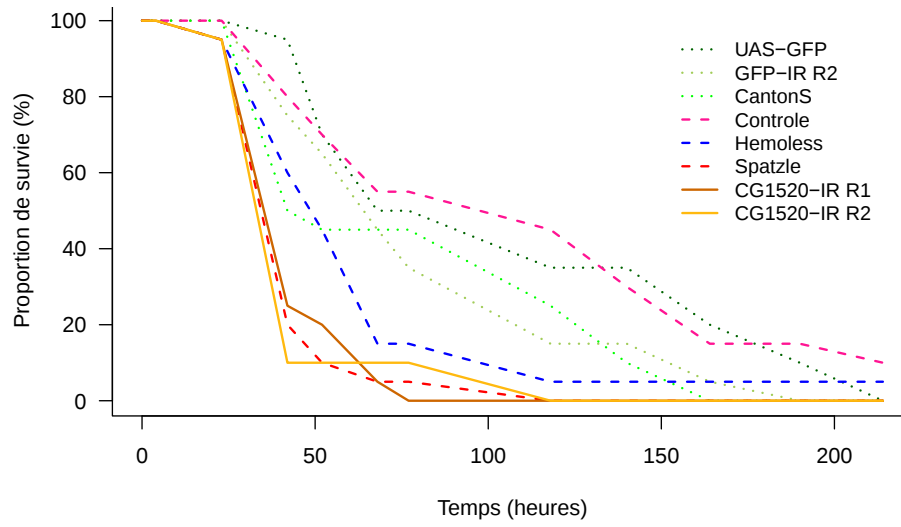
Comparaison des résultats obtenus pour *S. aureus* et *S. typhimurium*.

La majorité des gènes testés en réponse à une infection par *S. typhimurium* présente un phénotype de sensibilité accrue, alors que c'est une minorité dans le cas de *S. aureus*. Cette différence est peut-être liée à des caractéristiques propres aux deux espèces, par exemple la composition de la paroi bactérienne : *S. typhimurium* est une bactérie de type Gram négatif, alors que *S. aureus* est de type Gram positif.

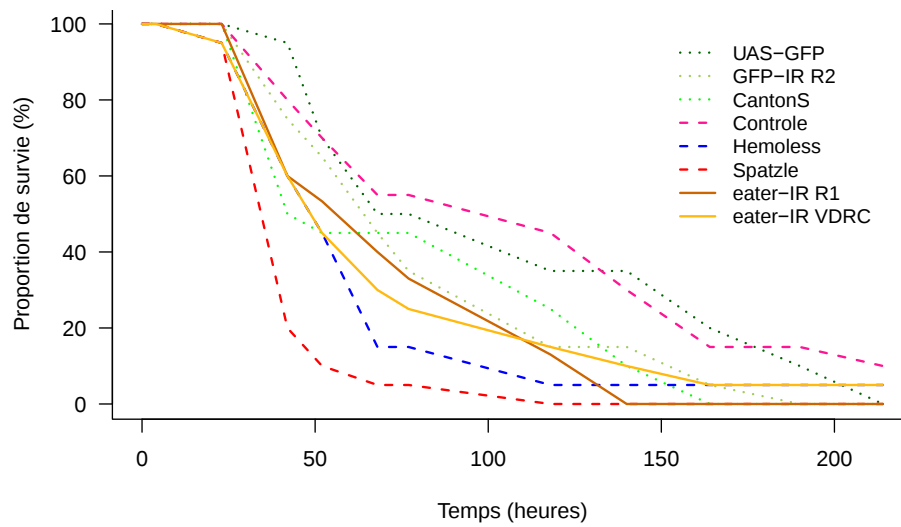
Le fait que certains gènes soient retenus face aux deux bactéries testées peut suggérer qu'ils sont requis de façon générale pour résister aux infections bactériennes, indépendamment de l'espèce qui est impliquée. Cette supposition doit être confirmée par des tests de résistance à une infection par d'autres bactéries, non testées ici.

3.2.2.3 Conclusion

Ce travail préliminaire nécessite d'être reproduit pour assurer la validité des observations rapportées ici. Cependant, la démarche est valide et peut apporter un bénéfice pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la phagocytose bactérienne par les hémocytes, et, plus généralement, les activités biologiques assurées par les hémocytes qui sont nécessaires à la résistance aux infections bactériennes. L'étape essentielle pour valider définitivement ces candidats est, dans la mesure où ils sont accessibles, d'effectuer ces tests sur des mutants de perte de fonction des gènes, puis de réintroduire le gène dans le fond génétique mutant pour vérifier par le sauvetage du phénotype le lien de causalité entre son niveau d'expression et le phénotype observé. En effet, le système d'interférence ARN génère parfois des phénotypes qui ne sont pas liés à l'inactivation du gène d'intérêt, mais dus à l'action du système sur un gène indépendant (appelé « Off target » en anglais). *A minima*, il faudrait s'assurer que les gènes ciblés dans cette étude subissent effectivement une dérégulation de leur expression lors de l'activation de l'ARN interférence à leur rencontre. Cependant, à cette étape de ma thèse, j'ai fait le choix de ne pas poursuivre dans cette direction, mais de m'engager plutôt dans l'étude d'autres types d'interactions entre un organisme multicellulaire et les microorganismes qui l'entourent : le commensalisme (voir chapitre 4).



(a) Exemple positif : le gène WASP



(b) Exemple négatif : certains tests avec le gène eater

FIGURE 3.1 – Exemples de résultats positif et négatif obtenus lors du crible de gènes impliqués dans la résistance aux infections par *S. aureus*.

Si l'inactivation du gène considéré provoque la mort des drosophiles aussi vite que les individus Hemoless, alors le gène est considéré comme ayant un rôle dans les hémocytes pour médier la résistance à l'infection. Si les drosophiles meurent moins vite que les individus Hemoless, le gène n'est pas retenu comme candidat.

3.2.3 Longévité

3.2.3.1 Introduction

Dans la nature, le mode de vie des adultes est fondamentalement différent de celui des larves, dans le sens où les larves sont globalement immobiles, c'est-à-dire qu'elles se développent à l'endroit où l'oeuf a été pondu, et ne peuvent échapper à la présence des microbes de l'environnement dans lequel elles évoluent ; alors que les adultes ont la capacité de se déplacer sur des distances nettement plus importantes, ce qui leur permet de chercher un environnement favorable. Au laboratoire, larves et adultes partagent le même environnement, et sont en contact avec les mêmes microorganismes, dont certains peuvent être des pathogènes opportunistes. Nous avons vu que les hémocytes garantissent un meilleur taux de survie au cours du développement larvaire de la drosophile, et qu'il s'agit d'assurer une défense contre les infections opportunistes. Nous pouvons nous demander si, au moins au laboratoire, ce même rôle est conservé chez l'adulte, une fois le développement terminé. Pour répondre à cette question j'ai effectué une étude de longévité, qui consiste à entretenir des groupes d'individus Hemoless et contrôles le plus longtemps possible, dans des tubes standard ou des tubes stériles, et mesurer la proportion de survivants au cours du temps. Les résultats sont présentés dans la figure 3.2, page 58.

3.2.3.2 Résultats et discussion

Considérations générales.

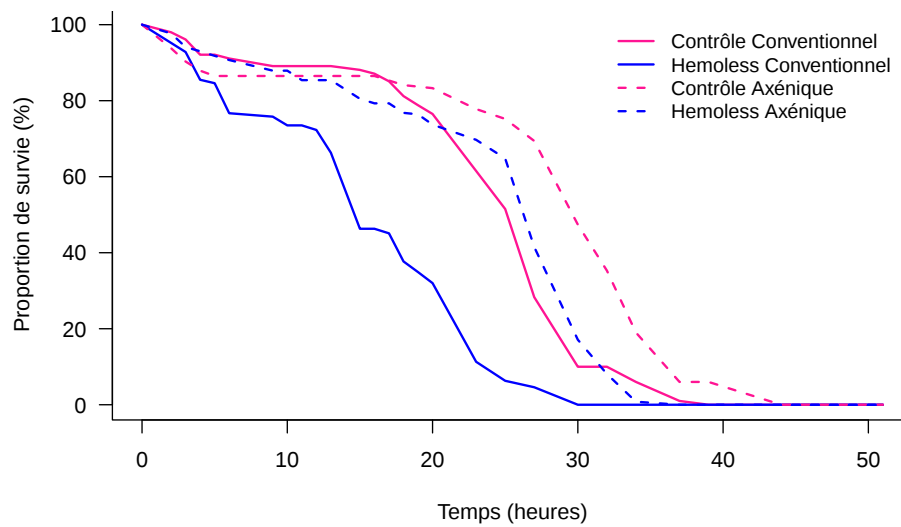
J'ai mesuré la durée de vie des individus Hemoless et contrôles en condition de culture conventionnelle ou axénique. La figure 3.2a, page 58 présente les résultats obtenus chez les mâles, et la figure 3.2b, page 58 ceux obtenus chez les femelles. D'une manière générale, la longévité des drosophiles dans notre étude, menée à 29°C, est similaire à ce qui a été rapporté ailleurs [25, 118, 209, 239] ; bien que d'autres ont rapporté des résultats différents [159]. Les différences observées entre laboratoires sont probablement dues au fond génétique des souches de drosophiles utilisées, à la composition de la nourriture qui leur est donnée, au nombre de mouches par groupe et la fréquence à laquelle les individus sont transférés dans un nouvel environnement.

Impact de la perte des cellules circulantes sur la longévité.

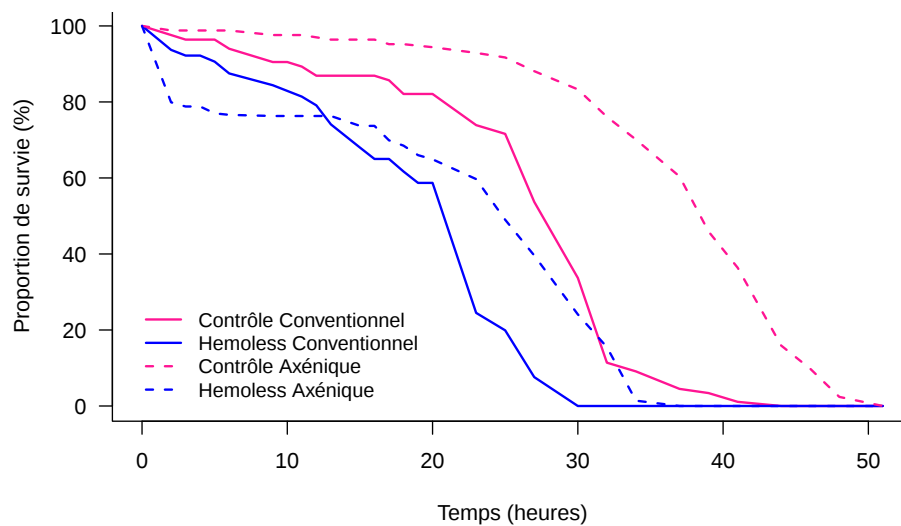
Nous constatons un impact négatif de la perte des cellules circulantes, puisque les individus Hemoless vivent moins longtemps que les individus contrôles, que ce soit en condition de culture conventionnelle ou axénique, chez les mâles comme les femelles. Ceci suggère un rôle des cellules circulantes dans la capacité de survie des drosophiles, mais qui n'est pas exclusivement immunitaire, puisqu'en condition axénique les individus Hemoless ne vivent pas aussi longtemps que les contrôles. Les cellules circulantes assurent donc une fonction de maintien de l'homéostasie de l'organisme, et contribuent à la bonne santé de l'animal même en absence de bactéries dans la niche écologique.

Au cours des dernières années, il est devenu clair que le vieillissement est marqué par une augmentation du stress oxydatif [15]. On peut imaginer que les hémocytes augmentent la longévité de l'organisme en participant à la gestion des stress oxydatifs, et de ce fait ralentissent le vieillissement. A ce jour, seulement 2 études ont établi un lien entre les hémocytes et la résistance aux stress oxydatifs [13, 198].

Le gène *glial lazaro* est exprimé dans le cerveau et les hémocytes. Il est impliqué dans la résistance au stress oxydatifs, ceux induit artificiellement ou ceux qui se produisent naturellement au cours du vieillissement. En particulier, son expression permet le maintien de l'intégrité et des



(a) Longévité des mâles



(b) Longévité des femelles

FIGURE 3.2 – Longévité des individus Hemoless et contrôles en condition conventionnelle ou axénique.

Longévité des individus Hemoless et sauvages mâles (a) et femelles (b) cultivés en condition conventionnelle ou axénique. Nombre de mouches par conditions : Mâles : Hemoless Conventionnel : 82 ; Contrôle Conventionnel : 102 ; Hemoless Axénique : 71 ; Contrôle Axénique : 81 ; Femelles : Hemoless Conventionnel : 65 ; Contrôle Conventionnel : 85 ; Hemoless Axénique : 75 ; Contrôle Axénique : 84.

fonctions métaboliques du corps gras, et influence nettement la longévité de l'animal : les mutants perte de fonction ont une durée de vie réduite, et les mutants de sur expression ont une durée de vie augmentée [198]. La contribution relative des hémocytes et du cerveau dans ces processus n'est pas définie, mais la surexpression du gène dans le cerveau seul ne produit pas le même phénotype que son expression simultanée dans les deux tissus [239].

Très récemment, il a été montré que l'expression du gène codant la protéine de choc thermique 70 ("heat-shock protein 70", *hsp70*) est nécessaire dans les hémocytes pour assurer la résistance aux stress oxydatifs (hyperoxie et hypoxie). Son niveau d'expression dans les hémocytes conditionne la capacité de survie lors de tels stress, où sa surexpression augmente la capacité de résistance et la survie, et sa dérégulation a l'effet inverse. Cette expression est liée à une diminution de la quantité globale d'espèces réactives à l'oxygène présentes dans l'organisme, qui sont produites lors de ces stress, et qui sont toxiques pour l'organisme [13].

Impact de la présence des bactéries sur la longévité.

Nous constatons également qu'en culture axénique, les drosophiles vivent plus longtemps qu'en condition conventionnelle, aussi bien les Hemoless que les contrôles, chez les femelles comme chez les mâles. Cette observation fait écho à ce que nous avons vu précédemment au cours du développement larvaire (Article 1, Figure 2h) et indique encore une fois que la présence de microbes dans l'environnement constitue une source de stress pour la drosophile, avec un effet négatif sur sa durée de vie.

Ces résultats contrastent d'une part avec les observations de Ren et al. [189] qui indiquent que les mouches élevées en condition axénique ont la même durée de vie que celles élevées en condition conventionnelle, et d'autre part avec celles de Brummel et al. [32] qui montrent que la présence de bactéries au cours de la première semaine de vie adulte augmente la durée de vie de l'animal. Il semble donc que la durée de vie de la drosophile soit le résultat d'un ensemble de plusieurs facteurs, impliquant entre autre les microbes de l'environnement, et que l'impact éventuel de la flore intestinale soit variable selon les conditions expérimentales. Parmi les facteurs environnementaux responsables de ces différences, on peut supposer que les espèces bactériennes présentes dans le milieu d'une part, et le régime alimentaire des drosophiles d'autre part entrent en compte. En effet, Ryu et al. [194] rapportent que la composition de la flore intestinale peut affecter la durée de vie de l'hôte, et le niveau d'activité métabolique de la drosophile peut lui aussi influencer la longévité de l'animal [50, 223].

Nous n'avons pas identifié les espèces composantes de la flore intestinale des drosophiles dans notre étude, mais cela a été fait dans les travaux de Ren et al. [189] et de Brummel et al. [32]. Le genre *Lactobacillus* (phylum Firmicutes) et la famille *Acetobacteraceae* (genres *Acetobacter* chez Ren et al., et *Gluconobacter* chez Brummel et al.) (Phylum *Proteobacteria*) sont communs aux deux études. Les spécificités particulières de chacune sont *Cladosporium sphaerospermum* (phylum *Bacteroidetes*) pour Ren et al., et *Staphylococcus*, *Anaerococcus* (phylum *Firmicutes*) et *Enterobacter* (phylum *Proteobacteria*) pour Brummel et al. Ces études ne sont pas quantitatives et ne permettent donc pas de comparer les flores avec finesse, mais il apparaît globalement que la flore des mouches chez Ren et al. est retrouvée, avec des espèces additionnelles, chez Brummel et al. A ce niveau là de comparaison des flores entre les deux études, il ne semble donc pas y avoir de grandes différences. Cependant, on ne peut négliger le fait que des variations de la composition de la flore, même subtiles, peuvent avoir des conséquences lourdes sur la santé de l'hôte [61, 157, 194], et le fait qu'au sein d'une même espèce bactérienne, différentes souches peuvent fournir des activités biologiques différentes [61, 71, 208], ce qui peut générer des impacts variables sur leur environnement et les animaux qui partagent leur niche écologique.

En ce qui concerne le régime alimentaire des drosophiles, les recettes utilisées sont différentes entre les 3 études (Table 3.2, page 60). Les quantités de sucres simples (Dextrose et Saccharose), sucres complexes (farine de Maïs) et protéines (Levure) varient entre les recettes. L'activité de la voie de l'Insuline et donc du métabolisme de l'animal étant directement en rapport avec la quantité de nutriment présent dans l'organisme [226], on peut imaginer que les différences entre ces recettes influencent l'activité de la voie de l'insuline, et indirectement la longévité de l'hôte. Cette hypothèse a été testée et validée par Skorupa, et al. [211], qui montrent que le rapport des concentrations de levure et de sucre influence de multiples paramètres physiologiques de l'animal, son comportement et sa longévité.

Ingrédients	Defaye et al.	Ren et al.	Brummel et al.
Dextrose	-	105 g/L	50 g/L
Saccharose	-	-	25 g/L
Maïs	80 g/L	50 g/L	170 g/L
Jus de fruits multifruits	80 mL	-	-
Levure	40 g/L	26 g/L	15 g/L
Agar	8.4 g/L	7.5 g/L	9 g/L
Acide propionique	-	1.9 mL (99%)	0.9 g/L
Acide phosphorique	-	-	0.9 g/L
Tegosept	-	1.7 g/L	-
Moldex	50 mL	-	-
Rapport Sucres / Protéines	2	6	16

TABLE 3.2 – Détails des différentes recettes utilisées dans les études de l'impact de la présence de microorganismes dans l'environnement de la drosophile sur sa longévité.
Le rapport Sucres / Protéines correspond au ratio de la somme des quantités de Sucres (Dextrose + Saccharose + Maïs) sur la quantité de Levure.

Conclusion.

La durée de vie des adultes, avec ou sans hémocytes, est réduite en milieu non stérile par rapport à un milieu stérile. Dans nos conditions expérimentales, les microbes de l'environnement ont donc un impact négatif sur la longévité des adultes. De plus, les hémocytes apportent une contribution à la durée de vie en stade adulte, à la fois dans un environnement non stérile et dans un environnement stérile, ce qui suggère un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'organisme qui n'est pas exclusivement anti-infectieux.

3.3 Conclusion

Nous nous étions posé la question de savoir si les cellules circulantes présentes chez la drosophile sont impliquées dans la résistance aux infections bactériennes systémiques chez l'adulte. Nous avons développé une stratégie qui consiste à éliminer cette population cellulaire et étudier les conséquences de leur absence lors de la réponse à divers types d'infections. Cette stratégie s'est avérée fructueuse, et nous a permis de répondre à la question que nous nous étions proposé d'aborder. Les hémocytes sont effectivement requis pour résister à certaines infections, mais pas

toutes. Leur activité biologique principale dans cette fonction semble être la phagocytose. Par ailleurs, nos résultats ont été confirmés par d'autres équipes.

Ce travail soulève de nouvelles questions, et le modèle utilisé peut servir pour y répondre. Il serait intéressant de caractériser plus en détail les mécanismes moléculaires de la phagocytose. Nous avons entrepris un crible génétique pour identifier des gènes impliqués dans ce processus, et ce crible peut être poursuivi. Nous avons également observé une réduction de la longévité de l'animal liée à la perte des hémocytes. Il semble que cette diminution soit due à la fois à un rôle immunitaire, mais aussi à un rôle non immunitaire de ces cellules. Il serait judicieux de mesurer l'évolution de la charge bactérienne au cours du vieillissement chez les individus Hemoless et la comparer à celle des individus contrôles. Il serait aussi envisageable, comme il l'a été pour la phagocytose, de mener un crible génétique pour identifier les gènes requis chez dans hémocytes pour assurer une longévité maximale.

La létalité larvaire et la réduction de la durée de vie chez l'adulte en environnement non stérile indiquent un impact de la communauté microbienne résidente de la niche environnementale sur la qualité de vie de la drosophile. On peut donc imaginer que la présence des microorganismes influence de multiples aspects de la vie de la drosophile. C'est pourquoi pour la suite de mon travail de thèse j'ai souhaité m'intéresser aux relations hôte – microbes en dehors des situations d'infections, et j'ai entrepris l'étude des relations de commensalisme entre la drosophile et la communauté microbienne qui partage son habitat.

Chapitre 4

Commensalisme

4.1 Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la flore microbienne de l'environnement affecte la qualité de vie de la drosophile, en particulier le taux de survie durant les stades larvaires et la longévité chez l'adulte. J'ai entrepris l'étude des relations de commensalisme entre la drosophile et les populations bactériennes qu'elle côtoie avec 2 objectifs : je souhaite évaluer l'impact de la présence des bactéries sur la physiologie et le métabolisme de l'animal d'une part, et l'impact de l'activité du système immunitaire de l'hôte sur ces mêmes phénomènes d'autre part. Je me pose donc la question de la composition de cette communauté bactérienne et de son impact chez la drosophile en tant qu'organisme hôte sain. Je m'interroge notamment à propos de son influence sur le renouvellement de l'épithélium intestinal et sur la physiologie de l'intestin. De plus, je souhaite évaluer le rôle du système immunitaire de la drosophile dans ces processus.

Il existe en effet, chez l'homme, des maladies d'inflammations chroniques de l'intestin (MICI) qui sont dûes, entre autre, à une mauvaise régulation de l'activité de leur système immunitaire intestinal, qui ne tolère pas la présence des bactéries et déclenche systématiquement une réaction agressive à leur rencontre, notamment l'inflammation. Ces maladies portent atteinte à la qualité de vie des patients, qui doivent suivre des régimes alimentaires adaptés pour éviter de stimuler leur système immunitaire [114] et souffrent de la destruction progressive de leur épithélium intestinal à cause de l'inflammation trop fréquente du tissu. Cette destruction, à terme, augmente considérablement le risque de développer un cancer du colon [120]. Une mutation dans le gène *nod2*, impliqué dans une voie de signalisation de type NF- κ B a été identifiée comme l'un des facteurs de la mauvaise régulation de l'activité du système immunitaire chez certains patients [106, 169].

Chez la drosophile, la voie IMD, qui est la voie de signalisation majeure pour déclencher la synthèse de peptides antimicrobiens dans l'intestin, repose elle aussi sur un facteur de transcription de type NF- κ B. J'ai donc voulu savoir si une dérégulation de la voie de signalisation IMD chez la drosophile provoque une dérégulation de l'activité du système immunitaire et des dégâts sur l'épithélium intestinal. Pour répondre à cette question, j'ai utilisé une souche mutante pour le gène *pims*, qui code la synthèse d'un régulateur négatif de la voie de signalisation IMD. La perte de ce gène induit une hyperactivation de cette voie en présence de la flore intestinale et la surproduction de peptides antimicrobiens [139]. J'ai donc étudié les populations bactériennes et leur impact sur la drosophile en utilisant en parallèle une lignée de drosophiles sauvages et une lignée portant une mutation de type perte de fonction du gène *pims*, l'allèle *pims^{Ey}*.

J'ai commencé l'étude du commensalisme chez la drosophile en caractérisant la flore bacté-

rienne qui, au sein de notre laboratoire, lui est associée. Pour cela j'ai analysé la flore bactérienne présente à l'intérieur du corps des drosophiles à la fois qualitativement (section 4.2.2, page 63) et quantitativement (section 4.2.3, page 74). Fort de cette connaissance, j'ai décidé de mettre au point un nouveau modèle expérimental, dont le but est de standardiser la composition de la communauté microbienne présente dans l'environnement de la drosophile (section 4.3, page 76). Puis j'ai voulu voir si la flore intestinale de la drosophile a un impact sur la physiologie de son hôte, à l'échelle de l'intestin et à l'échelle de l'organisme entier. Pour cela j'ai observé le taux de renouvellement de l'épithélium intestinal (section 4.4, page 80) et j'ai quantifié l'activité physiologique du tube digestif (section 4.5, page 87). Enfin, j'ai procédé à une analyse du transcriptome de l'animal, en présence ou en absence de flore, sur l'organisme entier ou l'intestin isolé, chez les individus sauvages et les mutants *pims^{Ey}* (section 4.6, page 97).

4.2 Caractérisation de la flore commensale des drosophiles adultes.

4.2.1 Introduction

La première étape dans l'étude de la relation de commensalisme entre un animal et les microorganismes de son environnement consiste à effectuer la caractérisation de la flore commensale associée à cet animal. J'entend par « flore commensale associée » l'ensemble des microorganismes qui partagent la même niche écologique et vivent sur la même ressource nutritive que l'animal, ce qui dans le cas de mes lignées de drosophiles correspond au tube dans lequel elles évoluent. Cependant, en ce qui concerne l'identification des espèces bactériennes associées à la drosophiles, je ne m'intéresse ici qu'aux bactéries présentes à l'intérieur de l'organisme de la drosophile.

La flore intestinale de l'animal se constitue avec les espèces microbiennes présentes dans son environnement, mais ne contient peut-être pas toutes les espèces de l'environnement [42]. J'ai voulu caractériser la flore microbienne interne de la drosophile, c'est à dire la communauté microbienne présente à l'intérieur de son organisme, et en particulier dans son intestin. Pour analyser qualitativement cette flore, j'ai procédé à l'identification des espèces présentes à l'intérieur du corps de la mouche entière d'une part, et à l'intérieur de l'intestin isolé après dissection d'autre part (section 4.2.2, page 63). Puis j'ai analysé quantitativement la communauté présente dans le corps de la mouche entière en évaluant le nombre de bactéries vivantes qu'elle contient (section 4.2.3, page 74).

4.2.2 Analyse qualitative de la flore microbienne associée aux individus élevés en condition conventionnelle

4.2.2.1 Démarche expérimentale

Choix d'une stratégie.

Deux stratégies sont envisageables pour identifier les espèces bactériennes qui composent le microbiote de la drosophile. Je peux identifier les microorganismes sur des critères physiologiques et morphologiques, ou bien sur une analyse moléculaire de leur génome.

La première méthode consiste à isoler les différentes espèces bactériennes par des méthodes de culture en milieu sélectifs, puis d'une part d'analyser la morphologie des cellules bactériennes, et d'autre part de les soumettre chacune à une série de tests microbiologiques dont le but est de révéler leurs aptitudes métaboliques face à une série de substrats. En notant les capacités de culture sur différents milieux sélectifs d'une espèce bactérienne, ses critères morphologiques et

ses activités métaboliques, il est possible de l'identifier, en se référant à la taxonomie existante. Cette méthode a l'avantage de produire une description relativement riche des bactéries isolées, mais requiert la capacité de cultiver les bactéries, ce que je ne peux pas garantir *a priori*.

La deuxième méthode consiste à isoler les molécules d'ADN génomique des bactéries, séquencer un gène de référence (en l'occurrence le gène qui code la sous unité 16S de l'ARN ribosomique) et comparer les séquences entre elles et avec une base de données¹ pour identifier l'espèce dont on a tiré l'ADN génomique. L'idée sous-jacente est que le gène de référence est soumis à une forte pression de sélection et de ce fait évolue très lentement dans l'histoire des espèces, ce qui permet de considérer que si deux bactéries ont une séquence codante très similaire pour ce gène, alors c'est qu'elles font partie de la même espèce. L'avantage de cette méthode est la simplicité de mise en oeuvre, mais elle comporte la particularité de ne pas différencier les bactéries vivantes de celles qui sont mortes. Il est donc possible de chercher à identifier une espèce en analysant l'ADN génomique bactérien issu des drosophiles, mais sans savoir si les bactéries considérées étaient vivantes ou mortes dans l'animal.

Dans mon cas, j'ai fait le choix de pratiquer la deuxième méthode. J'ai donc procédé à l'extraction et la purification des ADN génomiques bactériens à partir de mes stocks de drosophiles, et j'ai identifié les espèces bactériennes présentes sur la base de l'analyse de la séquence du gène codant l'ARN ribosomal 16S. Les étapes de cette procédure sont présentées dans la figure 2.1, page 26 (chapitre Matériels et Méthodes).

4.2.2.2 Résultats

J'ai analysé la flore de notre souche sauvage de référence : *yw* et du mutant *yw;pims^{Ey}*, dans la mouche entière préalablement stérilisée en surface et dans l'intestin moyen (voir figure 1.4, page 8). En suivant la stratégie présentée dans la figure 2.1, page 26, 4 banques de séquences ont été créées, contenant chacune 100 séquences. Les résultats sont présentés dans les figures 4.2 à 4.5, pages 70 à 73, et dans les tableaux 4.2 et 4.3, pages 65 et 66. La table 4.1, page 64 indique quels sont les genres bactériens qui ont été détectés dans l'eau, et qui sont exclus de l'analyse car considérés comme contaminants.

<i>Herbaspirillum</i> , <i>Hermiimonas</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Pelomonas</i> <i>Ralstonia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Undibacterium</i>
--

TABLE 4.1 – Liste des genres bactériens détectés dans l'eau.

Remarques générales sur la composition de la flore.

La première observation est que la flore commensale des drosophiles que nous cultivons au laboratoire contient un petit nombre d'espèces. En effet, au maximum 7 espèces sont détectées dans chaque banque. Six espèces ont clairement été identifiées, parmi lesquelles *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus plantarum* sont les plus représentées, et *Corynebacterium nuruki*, *Pectobacterium carotovorum* et *Ochrobactrum pseudogrignonense* sont les moins représentées. A ces 6 espèces connues s'ajoutent quelques espèces inconnues. Parmi les 11 séquences qui n'ont pas été assimilées à une espèce connue, 5 sont proches de *Enterococcus faecalis* et 1 est proche de *Aerococcus viridans*. Au final, seules 5 séquences représentent des

1. Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>

	Sauvage		<i>pims</i> ^{Ey}	
	Mouches	Intestins	Mouches	Intestins
<i>Aerococcus viridans</i>	69	0	52	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	85	19	38
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9	4	0	25
<i>Corynebacterium nuruki</i>	0	1	1	3
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0	0	0	3
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	0	3	0	0
Inconnues	1	4	3	3
Nombre total de clones	80	97	75	72
Nombre total d'espèces	4	6	4	7

TABLE 4.2 – Tableau récapitulatif des espèces identifiées dans les banques de clones 16S.

espèces nettement différentes des 6 identifiées, dont 3 sont proches de *Micrococcus luteus*, 1 de *Paenibacillus curdianolyticus*, et 1 de *Caulobacter segnis*. Ces informations sont résumées dans la table 4.3, page 66.

La figure 4.1, page 67 présente la courbe de raréfaction de mon jeu de données, et la table 4.4, page 66 rapporte les estimations de la diversité réelle obtenues par les méthodes de Chao et ACE [56, 105]. Nous constatons que les courbes de raréfaction des banques de séquences des intestins chez les sauvages et des organismes entiers chez les mutants atteignent un plateau, ce qui peut nous permettre de penser que ces banques contiennent un nombre suffisant de séquences pour évaluer la diversité au sein de ces populations microbiennes. C'est moins évident pour les 2 autres banques. Les estimations prédictives sont en accord avec cette observation (tableau 4.4, page 66) et indiquent que j'ai probablement réussi à capter la diversité des espèces microbiennes dans les échantillons des intestins sauvages et des organismes entiers mutants, mais peut-être pas de manière complète pour les autres. Par conséquent, il serait intéressant de séquencer un nombre plus important de clones dans ces deux banques afin de compléter cette analyse. Cependant, je n'ai pas entrepris de le faire.

La diversité de la flore de nos drosophiles, comprenant moins d'une dizaine d'espèces différentes, est moins importante que ce qui a été mesurée dans la nature (entre 10 et 20) [42, 59, 61] mais correspond à ce qui a été vu dans d'autres cultures de drosophiles entretenues en laboratoire [42, 61, 189, 194, 204, 244] et est très nettement inférieur à ce qui a été observé chez les mammifères, chez lesquels près de 400 espèces ont été formellement identifiées, avec une estimation de près de 550 espèces au total [69]. Deux des trois espèces majeures que nous avons identifiées dans nos stocks ont aussi été retrouvées par d'autres équipes dans leurs stocks et dans la nature : *Lactobacillus plantarum* [42, 61, 189, 194, 204, 244] et *Enterococcus faecalis* [61, 204]. La troisième espèce majeure, *Aerococcus viridans*, n'a pas été retrouvée dans les études mentionnées, ce qui suggère que sa présence dans la flore commensale de nos stocks de drosophiles est une particularité propre à notre laboratoire. Néanmoins, il semble qu'au regard des différentes études publiées la flore commensale de la drosophile contienne un petit groupe d'espèces, et que l'espèce *Lactobacillus plantarum* soit très souvent associée à cet animal, dans une large variété de niches écologiques.

Les différences de composition observées entre les différents laboratoires peuvent certainement être au moins en partie expliquées par les différences de recettes employées pour constituer les milieux de cultures utilisés pour entretenir les lignées de drosophiles. En effet, Sha-

Génotype	Banque	Clone	Id (%)	Genre & Espèce
Sauvages	Mouches	CRYW50	95	<i>Aerococcus viridans</i> ATCC11563
		GY21	96	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665
	Intestins	GY76	96	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665
		GY35	97	<i>Enterococcus faecalis</i> V583
		GY70	96	<i>Enterococcus faecalis</i> V583
<i>pims^{Ey}</i>	Mouches	CRP20	95	<i>Enterococcus faecalis</i> V583
		CRP50	97	<i>Enterococcus faecalis</i> V583
		CRP64	95	<i>Enterococcus faecalis</i> V583
	Intestins	GP60	96	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665
		GP69	96	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756
		GP99	93	<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i> YK9 ctg108

TABLE 4.3 – Tableau récapitulatif des clones non identifiés dans les banques de clones 16S. La colonne "Id (%)" indique le pourcentage d'indentité entre le clone et l'espèce dont il est le plus proche, présentée dans la colonne "Genre & Espèce".

	Sauvages		<i>pims^{Ey}</i>	
	Mouches	Intestins	Mouches	Intestins
Observées	4	6	4	7
Estimées par <i>Chao</i>	5	6 ± 0.7	4	10
Estimées par <i>ACE</i>	8.1 ± 1.6	6.5 ± 1.1	5.1 ± 0.9	10.6 ± 1.4

TABLE 4.4 – Estimations du nombre total d'espèces présentes dans les population microbiennes analysées.

ron et al., 2010 [204] rapportent que la composition de la nourriture qui est donnée aux drosophiles influence la composition de leur flore intestinale, et notamment les proportions de *Lactobacillus plantarum* et *Acetobacter pomorum* au sein de la communauté. En faisant varier le rapport Sucres / Protéines du régime alimentaire des drosophiles, ils ont observé un changement de type d'espèce bactérienne dominante, avec *Lactobacillus plantarum* associée au régime le plus riche en protéines, et *Acetobacter pomorum* associé à l'autre régime. L'impact du régime alimentaire sur la composition de la flore intestinale a aussi été observé chez les mammifères [137, 138].

Il est remarquable de noter que 2 des 3 espèces majeures qui composent la flore commensale de la drosophile, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecalis*, sont aussi retrouvées dans le tube digestif humain [5, 237]. Certaines souches de *L. plantarum* sont utilisées comme probiotiques^{2 3 4 5} et dans l'industrie agroalimentaire [28] alors que certaines souches de *E. faecalis* sont responsables d'infections gastro-intestinales opportunistes⁶, souvent observées en milieu hospitalier [237].

2. dieti-natura.com : <http://www.dieti-natura.com/digestion-digestion-bacteries-lactiques.html>

3. fleurancenature.fr : <http://www.fleurancenature.fr/complex-flore-intestinale.html>

4. aliv-e.com : <http://www.aliv-e.com/FR/product/prodspec/2175E.asp>

5. Et beaucoup d'autres...

6. Se dit d'une infection lorsqu'elle se produit principalement chez des individus déjà affaiblis, mais pas chez des individus initialement en bonne santé

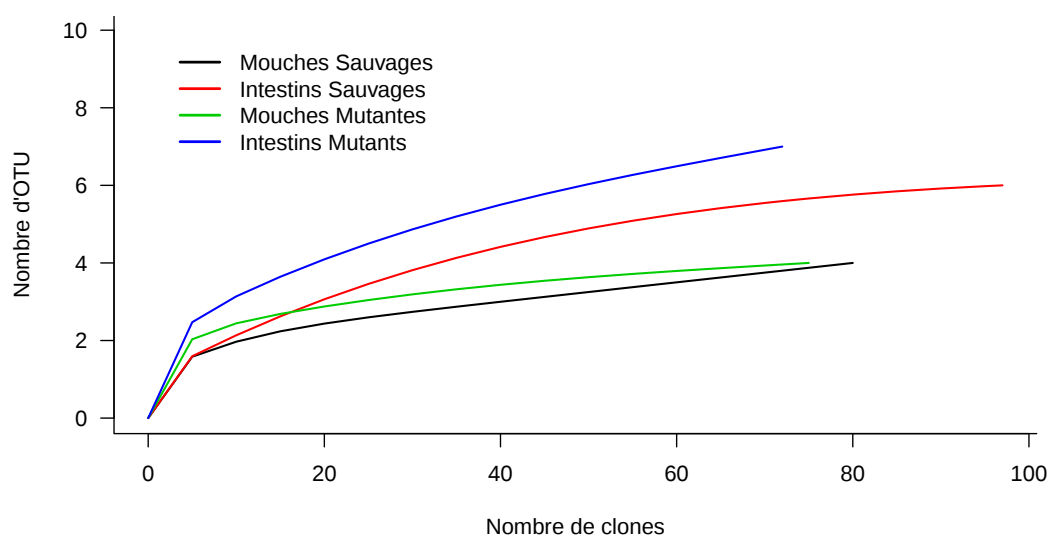


FIGURE 4.1 – Courbes de rarefaction des 4 banques de séquences.

Enfin, nous constatons l'absence de la bactérie *Wolbachia*, un hôte intracellulaire pourtant largement présent dans les cultures de drosophiles entretenues en laboratoires [51]. Cette absence s'explique probablement par le fait que les deux lignées de drosophiles étudiées ici (*yw* et *yw; pims^{Ey}*) ont été traitées à la Tetracycline par le passé, dans le cadre du travail qui a mené à la caractérisation du mutant *pims* [139]. Ce traitement antibiotique a certainement éliminé la bactérie *Wolbachia* si elle était présente, expliquant pourquoi elle n'est pas détectée dans ces stocks. Il a probablement aussi affecté la composition de leur flore intestinale, mais ces individus ont été nourris ultérieurement avec une nourriture additionnée de broyat de drosophiles élevées en condition conventionnelle, de sorte que leur flore a été rétablie avec les espèces que nous avons identifiées ici.

Les bactéries détectées dans l'organisme entier sont présentes dans l'intestin.

Deux des trois espèces majeures identifiées, *L. plantarum* et *E. faecalis*, semblent être présentes à la fois dans la mouche entière et dans l'intestin. C'est évident pour les deux espèces bactériennes dans les drosophiles sauvages, et pour *L. plantarum* dans les mutants *pims^{Ey}*. Cette observation suggère que ces deux espèces présentes à l'intérieur de l'organisme sont localisées dans l'intestin, sans toutefois exclure la possibilité qu'elles soient aussi présentes ailleurs, par exemple à d'autres endroits du tube digestif, en amont ou en aval de l'intestin.

De manière contre-intuitive, certaines bactéries qui sont présentes dans les intestins ne sont pas détectées en mouches entières. Bien que la méthode employée ne soit pas quantitative, on suppose que la proportion des différentes espèces dans les échantillons influence la probabilité de détecter chacune d'elles. En particulier, si une espèce est localisée dans l'intestin mais est peu représentée, il est possible qu'on ne puisse pas la détecter dans l'organisme entier avec le nombre de clones utilisés ici. En effet, l'espèce *A. viridans* n'est présente qu'à l'extérieur de l'intestin, ce qui dilue la probabilité de détection dans les drosophiles entières des espèces présentes dans l'intestin qui sont peu représentées. Ceci pourrait expliquer pourquoi les espèces minoritaires, détectées dans les intestins, ne sont pas systématiquement détectées aussi dans l'organisme entier. Pour tenter de s'affranchir de cette limitation technique, il faudrait séquencer un plus grand nombre de clones.

Localisation de bactéries à l'extérieur de l'intestin.

En contraste avec les espèces *L. plantarum* et *E. faecalis*, *Aerococcus viridans* est largement détectée dans les individus entiers mais n'est pas retrouvée dans les intestins isolés. Il semble donc que des espèces bactériennes peuvent être présentes à l'intérieur de l'organisme mais localisées en dehors de l'intestin. Il y a au moins deux possibilités pour expliquer cette observation : soit la bactérie est présente dans le tube digestif mais reste confinée dans la portion qui est en amont de l'intestin, soit elle est localisée dans un autre tissu.

Chez la drosophile, les tissus naturellement en contact avec le milieu extérieur en plus du tube digestif sont la cuticule de l'exosquelette, le système respiratoire et les plaques génitales. En ce qui concerne le système respiratoire, il a été rapporté qu'il est très difficile d'y faire entrer des microorganismes pour étudier leur réponse à l'infection [6, 222], ce qui suggère que cet organe est naturellement hermétique aux bactéries. Il y a donc une faible probabilité que *A. viridans* y soit un résident naturel. De même, le dépôt de bactéries (*Erwinia carotovora carotovora 15*) sur les plaques génitales de la femelle déclenche une réaction immunitaire à peine détectable [82], ce qui suggère que chez les femelles cet organe n'est pas une porte d'entrée pour les bactéries, et rend peu probable la présence de *A. viridans* à cet endroit. Enfin, les individus ont été lavés vigoureusement 3 fois dans un bain d'éthanol puis un bain d'eau autoclavée avant d'en extraire les ADN génomiques bactériens, donc il est peu probable que des microbes soient présents sur la surface extérieure de l'animal, bien qu'on ne puisse pas totalement exclure cette possibilité.

L'hypothèse la plus probable est donc que *A. viridans* soit présent dans la partie la plus antérieure du tube digestif, en amont de l'intestin. Cependant, cette remarque doit être nuancée en rappelant que la démarche effectuée ici n'est pas quantitative, et par conséquent si une espèce n'est pas détectée, on ne peut pas conclure avec certitude qu'elle est réellement absente. En effet, il y a peut-être des cellules de *A. viridans* qui parviennent jusque dans l'intestin, mais dont l'ADN génomique pas été collecté.

En conclusion, il semble que les espèces présentes à l'intérieur de l'organisme soient localisées dans le tube digestif, avec peut-être des préférences pour des régions particulières de cet organe selon les espèces. Il est en outre intéressant de rappeler les travaux de Chandler et al., [42] qui ont montré que le microbiote de la drosophile est différent de la flore présente sur la nourriture dont elles se nourrissent, ce qui suggère une forme de sélection de la part de la drosophile à l'encontre des espèces microbiennes qu'elle peut abriter. *Aerococcus viridans* est probablement soumis à ce genre de sélection.

Les drosophiles sauvages et mutantes *pims*^{Ey} ont la même flore commensale.

Nous constatons que les mêmes espèces bactériennes sont présentes dans les individus sauvages et les mutants *pims*^{Ey}. Nous n'observons pas de différences dramatiques dans la composition des flores associées à ces deux lots de mouches, si ce n'est la détection de *P. carotovorum* dans les mutants mais pas dans les sauvages, quoiqu'on ne puisse pas en conclure avec certitude qu'elles ne soit pas présente à très faible taux, en dessous de la limite de sensibilité de notre démarche.

Ryu et al. [194] ont rapporté que la perte de fonction du gène *caudal* provoque une dérégulation de la voie de signalisation IMD conduisant à une surproduction de peptides antimicrobiens dans la partie postérieure de l'intestin. Ils ont montré qu'elle est accompagnée d'un changement dans les proportions des différentes espèces qui composent la flore intestinale, en inversant les proportions de l'espèce dominante (*G707*) et d'une espèce minoritaire (*A911*). La situation chez le mutant *pims*^{Ey} est similaire à celle du mutant *caudal* car elle comporte une surexpression des gènes codant les peptides antimicrobiens en présence de la flore intestinale [139]. Par conséquent, on peut se demander si elle provoque aussi un changement dans les proportions des différentes

espèces. En spéculant sur les résultats obtenus, on pourrait imaginer qu'il y a une tendance variable selon le génotype de l'hôte, avec le rapport *E. faecalis* / *L. plantarum* en faveur de *E. faecalis* chez les sauvages et en faveur de *L. plantarum* chez les mutants *pims^{Ey}*. Mais il n'est pas possible de répondre clairement à cette question avec le jeu de données présenté ici, et il serait préférable d'augmenter sensiblement le nombre de clones séquencés dans chaque banque pour nous permettre d'évaluer finement les proportions de chaque espèce. Alternativement, il serait préférable de développer une méthode précise de quantification des différentes espèces bactériennes identifiées dans cette étude, par exemple en pratiquant des réactions de polymérisation en chaîne quantitative, avec des amorces spécifiques à chaque espèce.

Par ailleurs, les 3 espèces majeures identifiées dans notre laboratoire (*Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* et *Aerococcus viridans*) font partie du phylum des Firmicutes, alors que Ryu et al. [194] ont identifié non seulement des Firmicutes (*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis*) mais aussi des Protéobactéries (*Acetobacter pomorum*, A911 - Acetobacteraceae - et G707 - Gluconobacter). La différence de composition de ces flores bactériennes est probablement due à la différence de composition des nourritures qui sont données aux drosophiles : dans mon étude la recette contient la même quantité de levure et de maïs (80g/L), soit un ratio Sucres / Protéines valant 1 ; alors que dans l'autre étude la recette employée contient 96g/L de saccharose, 69.7g/L de maïs et 20g/L de levures, soit un ratio Sucres / Protéines valant 8.3. Les Protéobactéries ont probablement une préférence pour les milieux sucrés, ce qui expliquerait les différences de composition des flores intestinales des drosophiles. Cette hypothèse est soutenue par les récents rapports qui stipulent que la flore intestinale de la drosophile influence son métabolisme des sucres [190], probablement parcequ'elle consomme elle même une partie des sucres de l'alimentation et qu'elle produit des métabolites secondaire à son propre métabolisme (Acide lactique ou acétique par les genre *Lactobacillus* et *Acetobacter*, respectivement) d'une part ; et que la composition de la flore intestinale varie selon les stades du cycle de vie de son hôte, probablement en raison de changement dans les besoins énergétiques de la drosophile et des évolutions de sa physiologie en rapport avec le vieillissement d'autre part [244].

4.2.2.3 Conclusion

J'ai analysé la composition de la flore microbienne présente à l'intérieur des drosophiles que nous cultivons au laboratoire. Elle comporte moins d'une dizaine d'espèces, dont les 3 plus importantes sont *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* et *Aerococcus viridans*. Les deux premières sont présentes à l'intérieur de l'intestin mais pas la dernière, qui semble plutôt se maintenir dans une partie antérieure du tube digestif, en amont de l'intestin. *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecalis* ont été retrouvées par d'autres laboratoires dans leurs stocks de drosophiles et dans des populations capturées dans la nature, mais pas *Aerococcus viridans*, qui semble donc être une espèce spécifique à notre laboratoire. L'association *a priori* systématique de *Lactobacillus plantarum* avec la drosophile démontre que ces deux espèces animales sont capables de partager leurs ressources dans une multitude de conditions environnementales, et peut même suggérer qu'elle n'est pas neutre pour au moins l'une des parties. Puisque la flore intestinale des drosophiles au sein de notre laboratoire comporte un petit nombre d'espèces, il pourrait être relativement facile de manipuler sa composition afin de tester cette hypothèse.

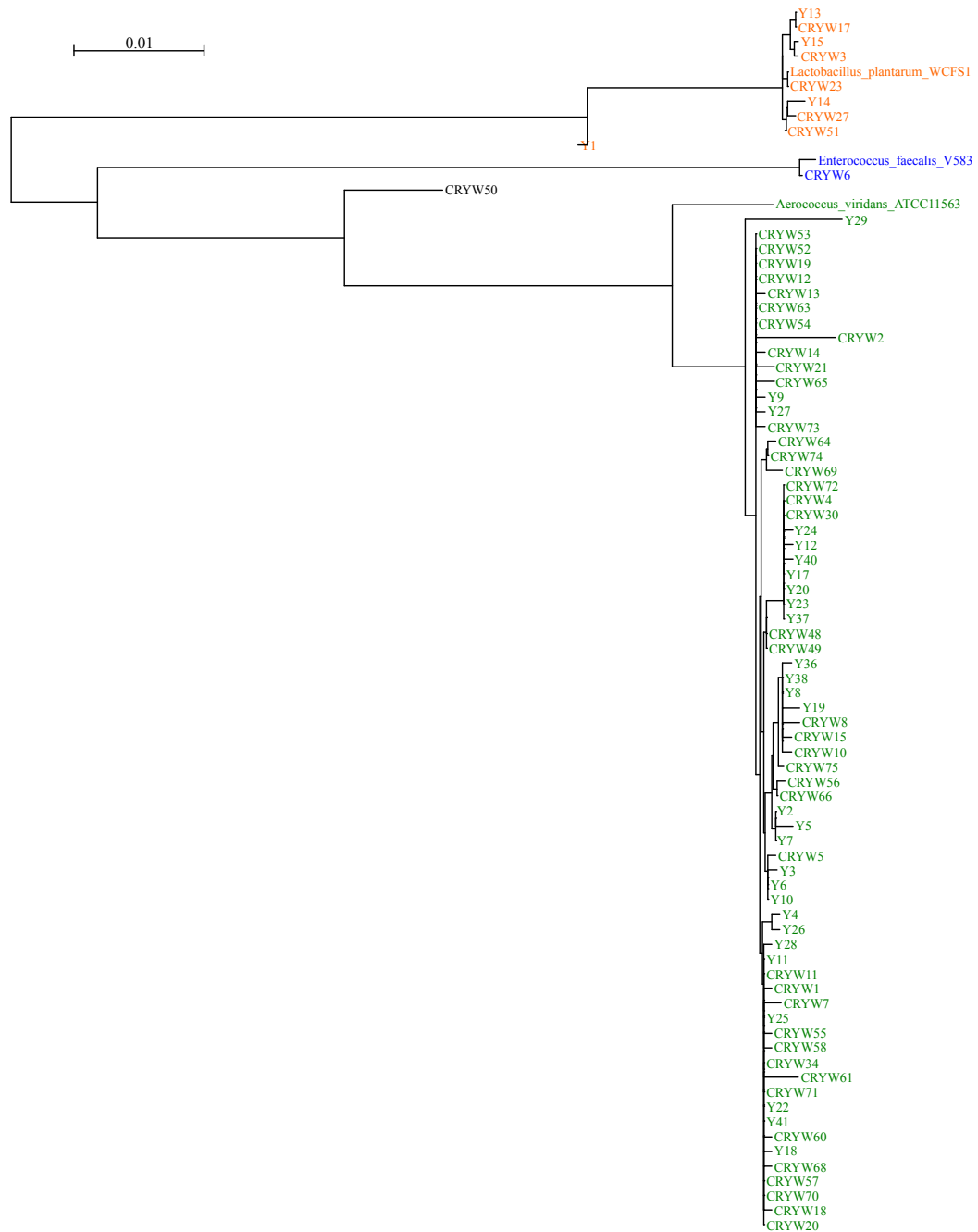


FIGURE 4.2 – Phylogénie des espèces présentes dans les drosophiles sauvages entières. Les clones d’une même couleur portent tous une séquence qui a au moins 98% d’identité avec la séquence de référence du groupe. Les clones noirs ont moins de 98% d’identité avec les séquences contenues dans les banques de données publiques. La barre d’échelle représente le nombre de substitutions par unité de longueur sur les branches de l’arbre.

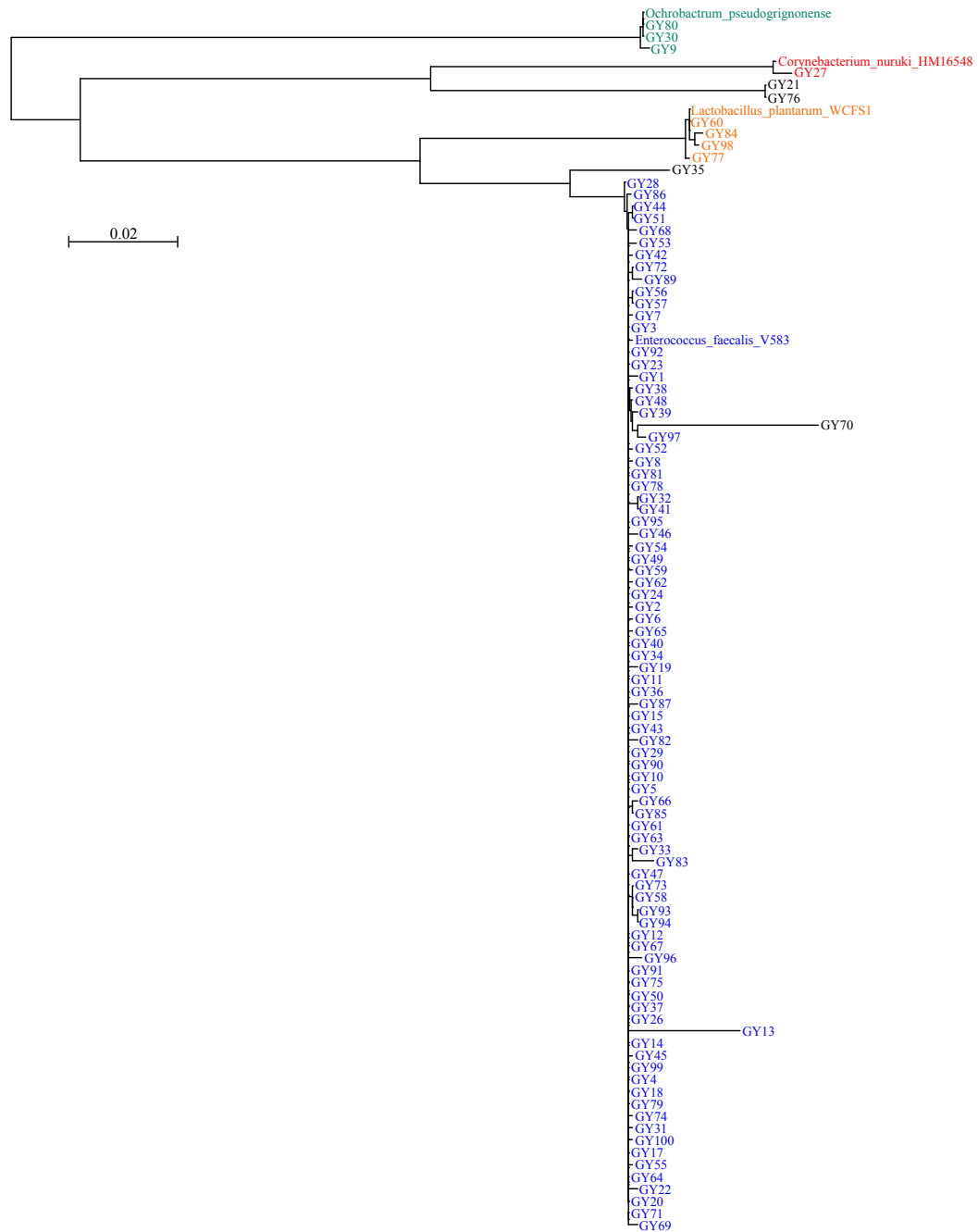


FIGURE 4.3 – Phylogénie des espèces présentes dans les intestins de drosophiles sauvages. Les clones d'une même couleur portent tous une séquence qui a au moins 98% d'identité avec la séquence de référence du groupe. Les clones noirs ont moins de 98% d'identité avec les séquences contenues dans les banques de données publiques. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions par unité de longueur sur les branches de l'arbre.

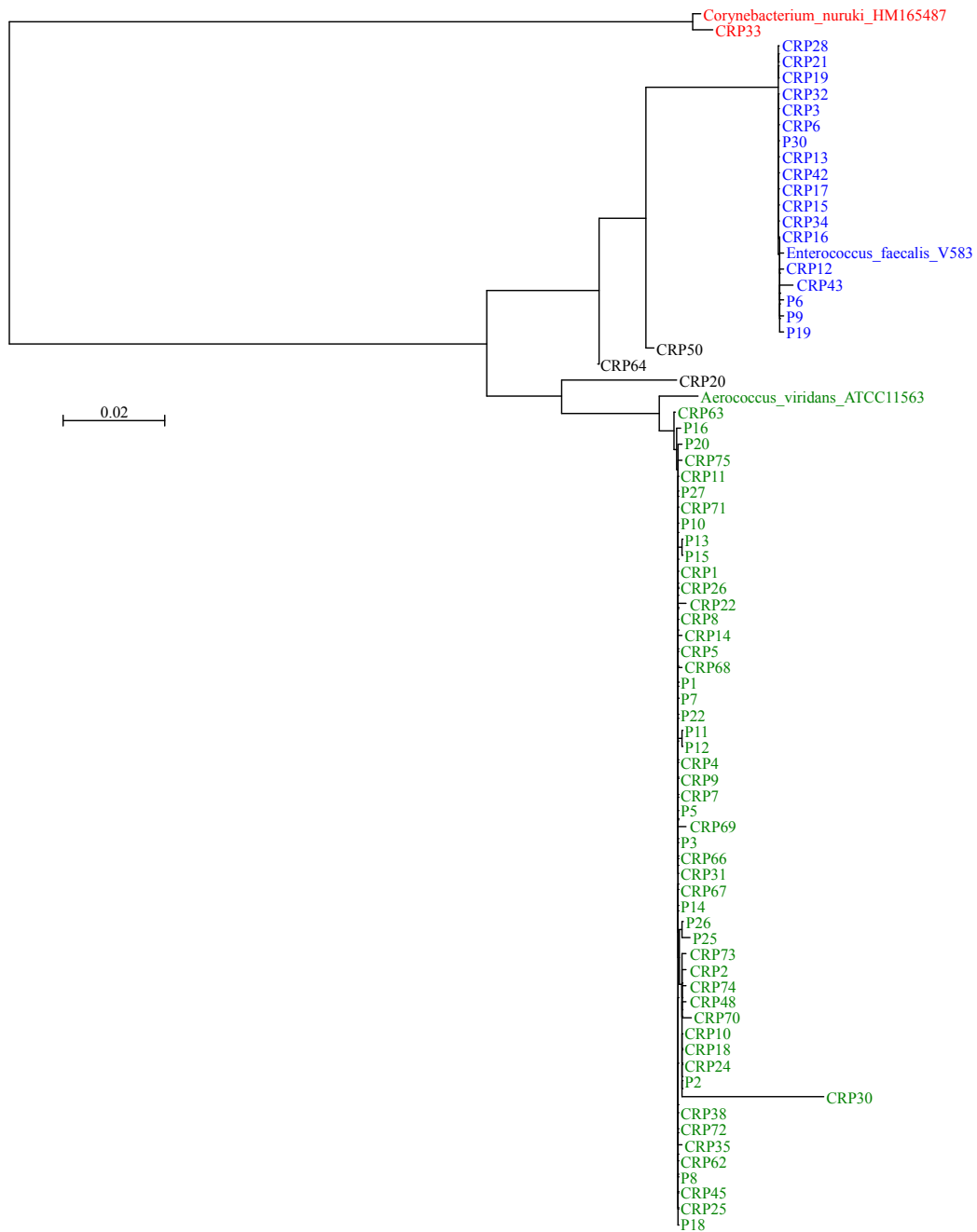


FIGURE 4.4 – Phylogénie des espèces présentes dans les drosophiles *pims^{Ey}* entières. Les clones d'une même couleur portent tous une séquence qui a au moins 98% d'identité avec la séquence de référence du groupe. Les clones noirs ont moins de 98% d'identité avec les séquences contenues dans les banques de données publiques. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions par unité de longueur sur les branches de l'arbre.

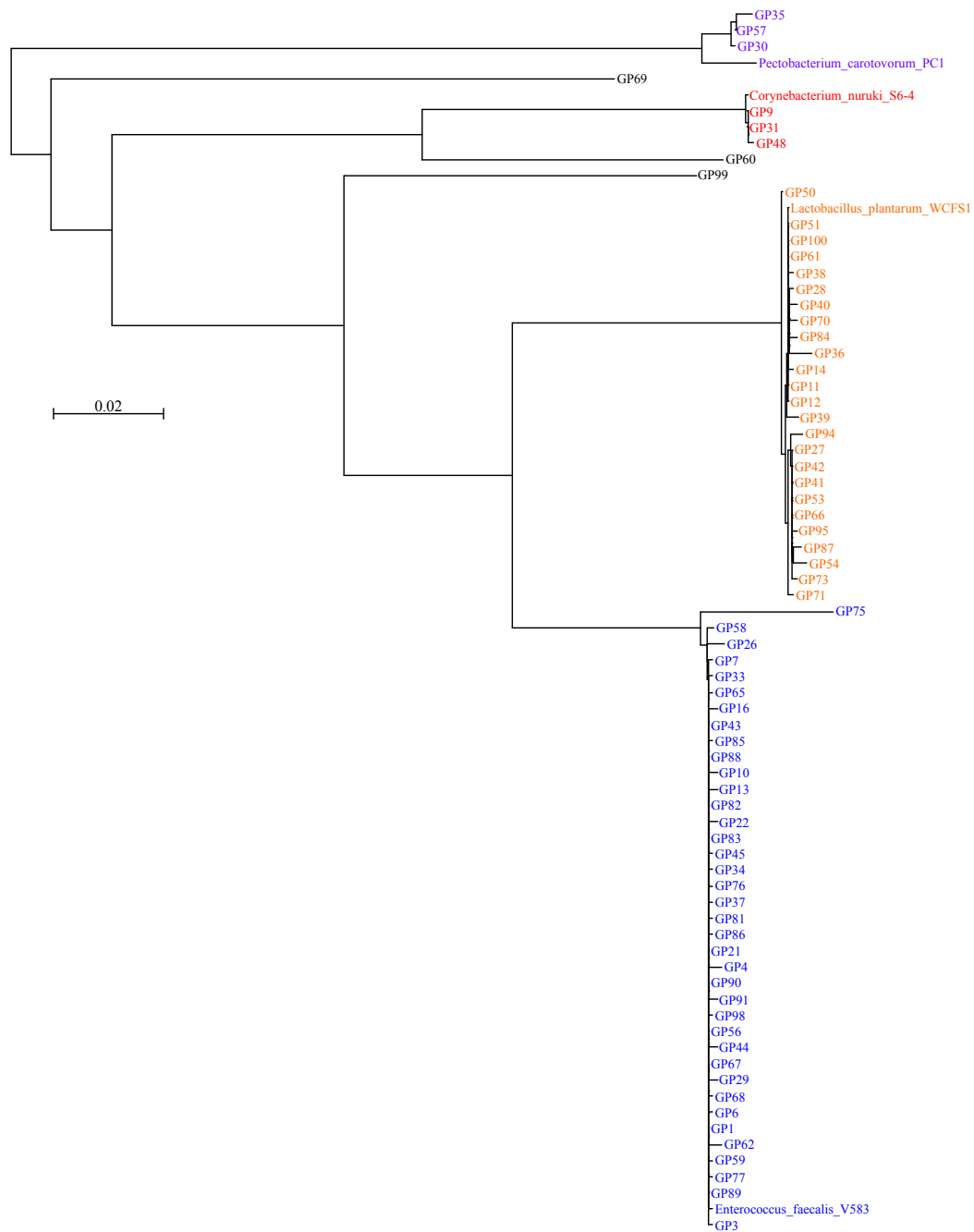


FIGURE 4.5 – Phylogénie des espèces présentes dans les intestins de drosophiles *pims^{Ey}*. Les clones d'une même couleur portent tous une séquence qui a au moins 98% d'identité avec la séquence de référence du groupe. Les clones noirs ont moins de 98% d'identité avec les séquences contenues dans les banques de données publiques. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions par unité de longueur sur les branches de l'arbre.

4.2.3 Analyse quantitative de la flore microbienne des individus élevés en condition conventionnelle

4.2.3.1 Objectif

Le but de cette analyse est d'évaluer l'ordre de grandeur de la charge bactérienne globale à l'intérieur des drosophiles. Je cherche à quantifier les cellules bactériennes vivantes dans l'organisme de la drosophile, sans discriminer les différentes espèces qui peuvent constituer cette population de microbes. C'est pourquoi, la méthode de quantification que j'ai décidé d'employer ne discrimine pas les espèces (voir la section 2.5, page 24 du chapitre Matériels et Méthodes).

4.2.3.2 Méthode

Il y a au moins deux façons de quantifier les cellules bactériennes à l'intérieur de l'organisme de la drosophile : une méthode basée sur la culture des cellules, et une méthode moléculaire, qui ne nécessite pas leur mise en culture.

La méthode moléculaire est basée sur la détection des molécules d'ADN génomique bactérien. Il s'agit de pratiquer une réaction de polymérisation en chaîne quantitative sur un gène donné, par exemple le gène codant la sous unité 16S de l'ARN ribosomal. Elle a l'avantage d'être précise sur les informations qu'elle donne et peut fournir une valeur absolue de quantification. Elle permet également de quantifier les espèces les unes par rapport aux autres et d'évaluer les proportions relatives de chacune, si elle est faite avec des amorces spécifiques à chaque espèce présente. Mais elle ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, ce qui peut introduire un biais dans les valeurs mesurées.

La méthode basée sur la culture des cellules consiste à broyer les individus, et étaler le broyat sur un milieu de culture bactérien gélosé. Après une période d'incubation destinée à favoriser le développement des bactéries sur la surface du milieu, il suffit de compter le nombre de colonies bactériennes qui sont devenues visibles, et rapporter la charge bactérienne obtenue en "unité formant colonie" (UFC) par individu. En effet, une colonie bactérienne peut être obtenue à partir d'un nombre variable de cellules, et on ne peut garantir qu'une colonie soit issue d'une seule cellule. Elle présente donc le désavantage de ne pas être précise, d'autant plus qu'elle présuppose que les bactéries présentes dans le corps de l'animal sont cultivables en condition d'aérobiose, ce qui n'est pas forcément le cas pour toutes les espèces. Mais elle a l'avantage de compter uniquement les cellules vivantes, et d'être à la fois rapide et peu coûteuse à mettre en oeuvre. Etant donné que je sais que les bactéries identifiées dans mes stocks de drosophiles sont cultivables en aérobiose, et que je ne cherche pas à mesurer finement les charges bactériennes de mes stocks de drosophiles, j'ai fait le choix d'utiliser cette méthode.

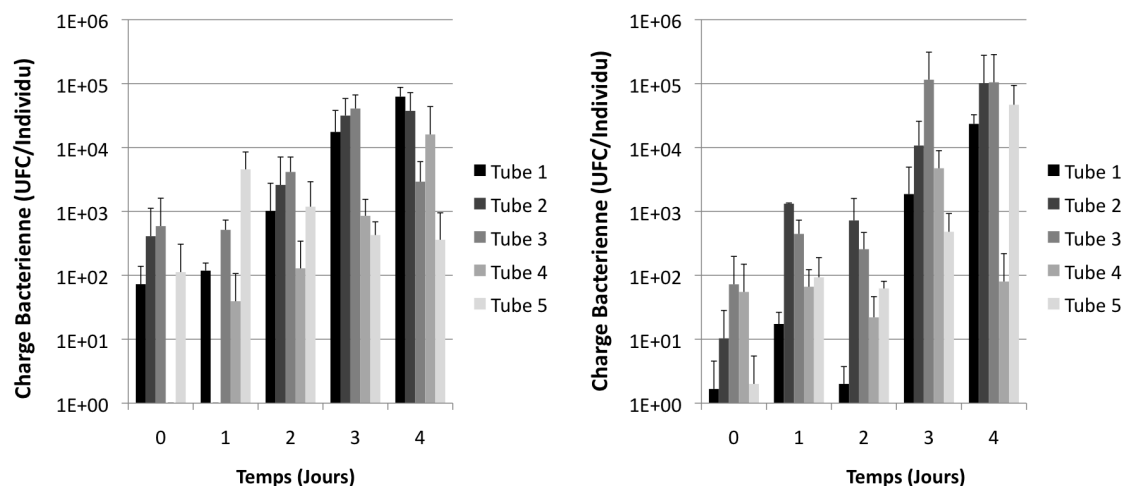
4.2.3.3 Charges bactériennes des drosophiles élevées en condition conventionnelle

Afin de savoir comment évolue la charge bactérienne des individus adultes élevés en condition conventionnelle dans les quelques jours qui suivent leur émergence, je l'ai mesurée quotidiennement sur des mâles et des femelles que j'ai prélevés pendant 5 jours. J'ai effectué ces mesures sur 5 tubes de culture différents, desquels je prélève un lot de mâles et un lot de femelles simultanément. J'ai mesuré en parallèle la charge bactérienne du milieu.

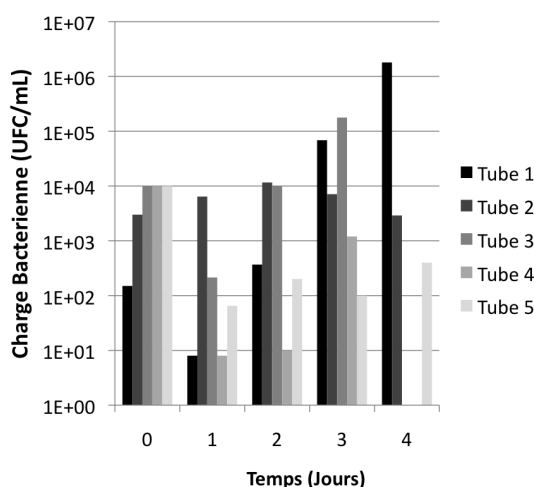
La démarche consiste à prélever les mouches à l'émergence et les placer dans un tube de milieu de culture neuf (Jour 0), et les conserver à 25°C comme d'ordinaire. 25 tubes ont été préparés ainsi, contenant chacun environ 40 mouches. A partir du jour 0 et pendant les 4 jours qui suivent, 5 tubes seront utilisés chaque jour pour mesurer les charges bactériennes des mâles, des femelles et du milieu. Les tubes ne sont donc utilisés qu'une seule fois chacun, et il n'y a pas de suivi au

cours du temps de la charge bactérienne d'une population de drosophiles qui serait issue d'un même tube.

La figure 4.6, page 75 présente les résultats obtenus. Nous constatons qu'il y a une tendance globale à l'augmentation au cours de temps chez les mâles et chez les femelles, mais ce n'est pas clair en ce qui concerne le milieu. L'évolution de la charge interne des drosophiles n'est par conséquent pas corrélée à celle du milieu.



(a) Charge bactérienne chez les femelles élevées en condition conventionnelle (b) Charge bactérienne chez les mâles élevés en condition conventionnelle



(c) Charge bactérienne du milieu incubé en condition conventionnelle

FIGURE 4.6 – Evolution de la charge bactérienne des mouches élevées en condition conventionnelle depuis l'émergence et pendant 4 jours ainsi que de leur milieu

Par ailleurs, nous constatons que la charge bactérienne des adultes est globalement très variable avec, à l'exception des mesures effectuées au jour 3, des groupes de drosophiles (mâles ou femelles) qui présentent moins de 10 unités formant des colonies (UFC)/individu à chaque temps,

ainsi que des groupes qui présentent plus de 1000 UFC/individus (sauf au jour 0 chez les mâles). Il y a donc une variabilité d'un facteur 1000 entre les populations issues des divers tubes. Cette variabilité est peut-être en partie liée au fait que les individus étudiés ici sont jeunes, et que la durée de la cinétique est courte. Les charges bactériennes sont probablement moins hétérogènes à des stades plus tardifs de la vie de l'animal. En ce qui me concerne, je travaille principalement avec des individus âgés de 7 à 10 jours.

Néanmoins, ce taux de variabilité peut être problématique lorsque nous souhaitons comparer ces individus à des individus axéniques, ce qui est un moyen d'évaluer l'impact de la présence de la flore sur les différents processus biologiques qui m'intéressent. En effet, nous considérons que les drosophiles élevées en condition conventionnelle sont fondamentalement différentes de celles élevées en condition stérile par le fait qu'elles possèdent une flore microbienne interne à leur organisme. Or, si une partie de ces individus contient moins de 10 UFC, il y a un risque que je ne puisse pas observer un impact de la flore chez eux en comparaison à des individus stériles, dans l'hypothèse où les éventuels impacts de la présence de la flore dépendent de la quantité de cellules bactériennes présentes. Il est donc nécessaire de mettre au point une nouvelle façon de cultiver les drosophiles qui réduise la variabilité dans les charges bactériennes entre individus d'une part et qui garantissent une charge minimum suffisante d'autre part. Dans la section suivante je présente une série de mesures que j'ai effectuées pour vérifier la faisabilité d'une approche visant à atteindre ces objectifs.

4.3 Mise en place d'un nouveau modèle expérimental.

4.3.1 Introduction

Une façon simple de renforcer la charge bactérienne serait de fournir des bactéries dans l'alimentation. Concrètement, cela consisterait à déposer sur le milieu de culture des microbes vivants. Etant donné la variabilité des charges bactériennes du milieu dans les tubes incubés en condition conventionnelle, on peut imaginer que cette façon de procéder permette aussi de réduire cette variabilité. Néanmoins, même si ce n'était pas le cas, l'objectif principal est d'assurer une charge minimale chez les drosophiles non stériles.

La question se pose de savoir s'il s'agit de développer une nouvelle façon d'entretenir des stocks, à partir desquels seront prélevés aléatoirement certains individus pour des besoins expérimentaux (comme ce fut le cas pour les mesures présentées dans la Figure 4.6, page 75), ou bien s'il s'agit plutôt de mettre au point un protocole de traitement des individus qui sont prélevés pour mener une expérience et dont on veut s'assurer qu'ils vont abriter une flore commensale non nulle. J'ai considéré que je suis dans une situation qui correspond surtout au deuxième cas évoqué. Il ne s'agit donc pas de traiter des stocks de drosophiles, mais des individus issus de ces stocks, juste avant de les soumettre aux diverses expériences que je prévois de mener avec eux.

Puisque le but final est de comparer des individus axéniques à des individus qui possèdent une flore commensale, j'ai voulu tenter de reconstruire une flore commensale artificielle chez des individus axéniques. Ainsi, ces individus auront évolué ensemble dans le même environnement jusqu'au moment où ils seront séparés pour constituer deux groupes distincts : axénique et non axénique.

4.3.2 Mise au point d'un processus de recolonisation des individus axéniques adultes.

Inoculation du milieu par des quantités variables de *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis* ou *Lactobacillus plantarum*.

Aerococcus viridans, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecalis* sont les espèces bactériennes majeures de la flore commensale des individus élevés en condition conventionnelle dans notre laboratoire (Table 4.2, page 65). On peut donc choisir de cultiver ces espèces bactériennes et les implémenter à notre milieu de drosophile. Pour cela il faut isoler, à partir des drosophiles, les souches bactériennes de ces différentes espèces. J'avais estimé à cette époque qu'il serait plus simple d'utiliser les souches bactériennes déjà isolées dans d'autres laboratoires, sans toutefois avoir de garanties sur le fait que leur utilisation produise les mêmes résultats que les souches endogènes à mes stocks de drosophiles personnels. J'ai obtenu de la part du Pr. Won Jae Lee⁷ une souche de *L. plantarum*, de la part du Pr. Bruno Lemaitre⁸ une souche de *A. viridans*, et de la part du Dr. Pascal Hols⁹ une souche de *E. faecalis*.

La figure 4.7, page 78 présente les charges bactériennes, à 72 heures après inoculation du milieu par des quantités variables de *E. faecalis* ou *L. plantarum*, de drosophiles femelles initialement stériles¹⁰ ainsi que celle de leurs intestins et du milieu. Les résultats obtenus avec *A. viridans* ne sont pas présentés ici car ils sont tous négatifs : la charge bactérienne des drosophiles et du milieu nutritif après inoculation de ce dernier avec cette bactérie est nulle. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que la souche utilisée est différente de la souche qui a été identifiée dans mes stocks de drosophiles et qu'elle n'est pas capable de coloniser le milieu ni l'animal, soit que la détection de *A. viridans* dans les drosophiles est artéfactuelle, ce qui est peu probable car cette espèce n'a pas été détectée comme contaminante (voir Table 4.1, page 64). Pour pouvoir étudier cette espèce et son impact dans la colonisation du tube digestif de mes stocks de drosophiles, il faudrait que je l'isole à partir de mes stocks de drosophiles. Cependant, puisque la majorité des études qui ont caractérisé la flore intestinale de drosophiles n'ont pas retrouvé cette espèce dans leur population microbienne, j'ai choisi de ne pas chercher à inclure cette bactérie dans mon processus de recolonisation, mais seulement les espèces qui sont aussi retrouvées dans les autres laboratoires, en l'occurrence *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecalis*.

La première observation est que *L. plantarum* est capable de coloniser le milieu, les drosophiles et leur intestin après inoculation du milieu nutritif avec les trois concentrations utilisées ici, alors que *E. faecalis* n'est capable de coloniser les mêmes zones que si elle estensemencée à la plus forte des concentrations testées. Le volume utilisé pour l'inoculation du milieu avec les solutions bactériennes à DO=1 contient environ 10⁷ bactéries dans les deux cas.

La deuxième observation est que les charges bactériennes des mouches et intestins sont toutes supérieures à 1000 UFC/individus chez les drosophiles placées dans les milieux qui ont reçu la plus forte quantité de *E. faecalis* ou *L. plantarum*, ce qui est comparable avec les observations faites à J3 chez les individus élevés en condition conventionnelle (Figure 4.6, page 75). Ainsi l'introduction d'une seule espèce bactérienne dans un milieu utilisé pour nourrir des individus axéniques suffit pour que ces individus possèdent une charge bactérienne comparable à celle des individus élevés en condition conventionnelle. Cette observation suggère qu'une espèce commensale est capable à elle seule de coloniser entièrement la niche telle qu'on l'observe dans le cas de

7. College of Natural Science, Seoul National University, San 56-1, Sillim-9dong, Gwanak-gu, Seoul, 151-747, Korea

8. Global Health Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland

9. Katholieke Universiteit of Leuven, Institute of Life Sciences, BGMB Research group Bg Carnoy (b.206) 5 Croix du Sud (Box 6) B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

10. La stérilité des individus élevés en condition axénique a été vérifiée

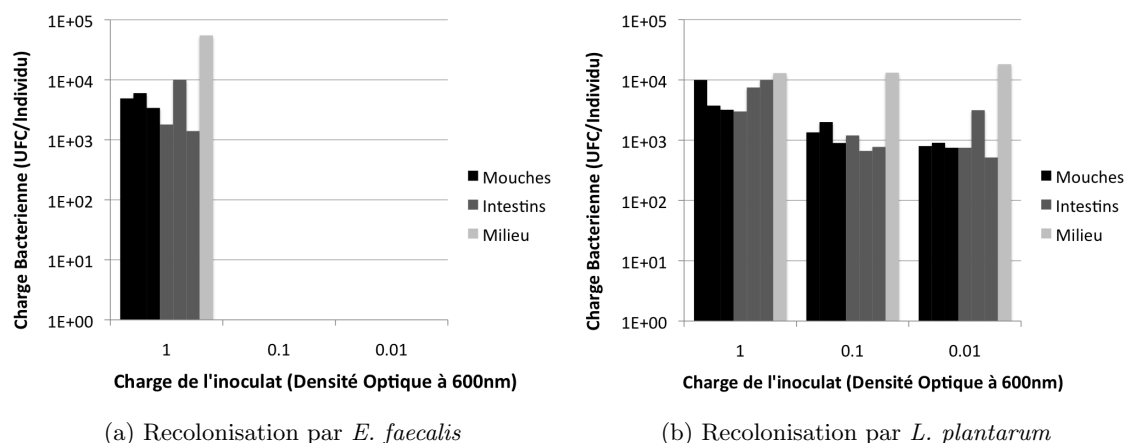


FIGURE 4.7 – Charge bactérienne des femelles à 72h après inoculation de diverses quantités de *L. plantarum* ou *E. faecalis* dans le milieu nutritif

drosophile élevées en condition conventionnelle, dont on pense qu'elles abritent plusieurs espèces bactériennes (Table 4.2, page 65). De plus, on peut imaginer que s'il existe une forme de compétition entre les différentes espèces commensales, la première des espèces qui s'implante dans l'animal pourra s'étendre dans la niche et gagner un avantage sur une éventuelle autre espèce qui arriverait ensuite, ce qui est cohérent avec le fait que toutes les bactéries de l'environnement ne sont pas retrouvées dans le microbiote du tube digestif [42], et que la présence de certaines espèces ou ordres bactériens sont mutuellement exclusifs avec d'autres espèces ou d'autres ordres [42, 194]. Cependant, le phénomène de co-occurrence de différentes espèces, qui est l'inverse de l'exclusion, existe aussi et a été observé chez les mammifères [74].

Evolution de la charge bactérienne des individus après inoculation du milieu par *Enterococcus faecalis* ou *Lactobacillus plantarum*.

Afin de vérifier si les bactéries persistent dans les drosophiles au cours du temps, j'ai mesuré la charge bactérienne dans les femelles à 3, 6 et 9 jours après ensemencement du milieu par *E. faecalis* à DO=1 (10^7 CFU) ou *L. plantarum* à DO=0.01 (10^5 CFU). Les résultats, présentés dans la figure 4.8, page 79, montrent que les bactéries sont retrouvées dans les mouches à chaque jour, sauf dans deux répliquats sur trois pour *L. plantarum* au jour 9. Globalement, les charges bactériennes sont toujours supérieures ou égales à 1000 UFC par individu, et la variabilité entre répliquat est réduite par rapport aux individus élevés en condition conventionnelle. On constate également une charge bactérienne toujours plus forte dans le milieu que dans les mouches.

Persistance de *Lactobacillus plantarum*.

Le fait que 2 des 3 répliquats du jour 9 après recolonisation par *Lactobacillus plantarum* ont une charge bactérienne nulle m'a poussé à vérifier de manière plus stricte la capacité de cette bactérie à persister à l'intérieur de l'organisme de la drosophile au cours du temps. Pour cela, j'ai procédé à une recolonisation du milieu par *L. plantarum* puis j'ai transféré les mouches dans un tube frais (non contaminé) matins et soirs pendant 6 jours, et j'ai évalué la charge bactérienne des animaux et du milieu tous les soirs. La figure 4.9, page 79 montre que l'association de

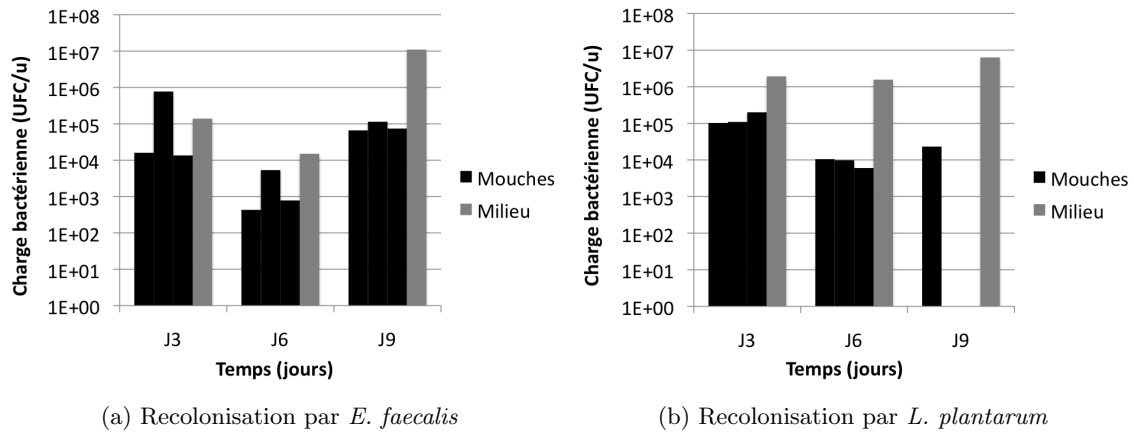


FIGURE 4.8 – Evolution de la charge bactérienne après inoculation du milieu par *L. plantarum* ou *E. faecalis*

L. plantarum avec les drosophiles est persistante et stable au cours du temps. Nous constatons que la charge des mâles oscille entre 10^2 et 10^4 UFC par individu, et qu'elle est inférieure à celle des femelles qui oscille entre 10^3 et 10^6 UFC par individu. Bien que cette étude ne permette pas véritablement de dire si la bactérie réside perpétuellement dans le tube digestif de l'animal ou bien si elle est constamment acquise à partir de l'environnement, nous pouvons conclure que *L. plantarum* est capable de persister dans son association avec les drosophiles.

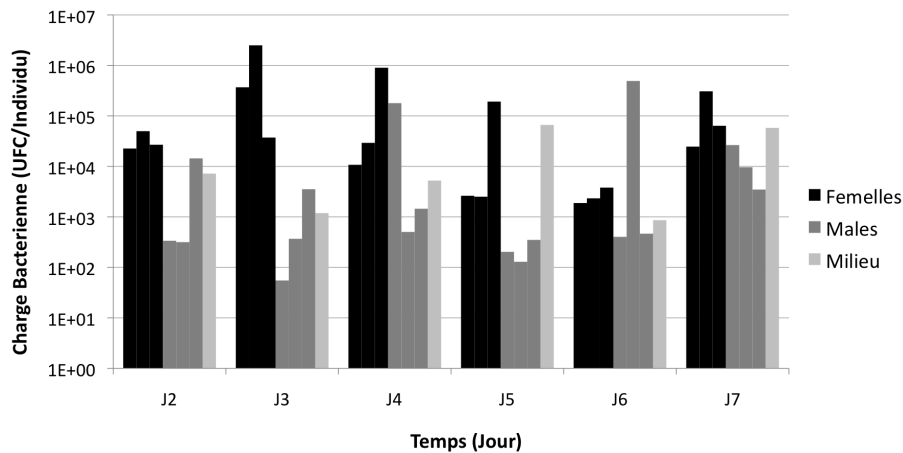


FIGURE 4.9 – Evolution de la charge bactérienne pendant 7 jours après inoculation du milieu par *L. plantarum* à DO=0.01 et en transférant les mouches dans des tubes neufs matins et soirs.

4.3.3 Conclusion

Cet ensemble de données montre qu'il est possible de coloniser le tube digestif de drosophiles préalablement maintenues dans un environnement stérile et que la population bactérienne nouvellement acquise reste présentes dans le corps de la mouche de façon stable sur une période

d'au moins neuf jours, à des niveaux supérieurs à 10^3 UFC/individu chez les femelles, et 10^2 UFC/individus chez les mâles. Nous avons l'habitude au laboratoire de travailler principalement avec les femelles, donc ce résultat me convient pour le but que je m'étais fixé : assurer une différence en terme de charge bactérienne interne entre individus stériles et non stériles. Dorénavant, pour le reste de mon travail de thèse, j'ai mis en place et utilisé de façon routinière une nouvelle méthode de travail au laboratoire qui consiste à nourrir les jeunes adultes (<48h) avec une solution de bactéries pendant 7 jours avant de les utiliser pour les diverses expérimentations auxquelles je devais les soumettre.

Dans la grande majorité des cas, cette solution de bactéries est composée de 4 espèces, appartenant à 2 phyla majeurs retrouvés dans les drosophiles, que sont les Firmicutes et les Proteobacteria. Ces 4 espèces sont *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* (Firmicutes), *Acetobacter pomorum* et *Commensalibacter intestini* (Proteobacteria). Ces souches nous ont été fournies par le Pr. Won Jae Lee [194]. En effet, j'ai jugé préférable de travailler avec des espèces bactériennes déjà caractérisées, or à cette époque les souches endogènes de *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecalis* de notre laboratoire n'étaient pas encore caractérisées. Je n'ai pas vérifié si, après que les mouches soient recolonisées par ce cocktail de bactéries, les proportions de chaque espèce microbiennes évoluent au cours du temps dans l'animal ; mais je me suis assuré au cours de chaque expérimentation que la charge bactérienne globale était à un niveau satisfaisant.

J'ai ainsi mis au point une nouvelle façon de travailler, qui consiste à standardiser les conditions environnementales dans lesquelles évoluent les drosophiles adultes pendant une semaine avant leur participation aux expérimentations. Il s'agit de prélever des jeunes adultes dépourvus de flore commensale et, soit de les conserver en environnement axénique pour les maintenir sans flore, soit les placer dans un environnement contenant une quantité précise d'un ensemble précis de bactéries, afin d'assurer la colonisation de leur tube digestif par une flore microbienne standardisée. Ces nouvelles conditions de travail m'ont permis d'étudier l'impact de la flore commensale de la drosophile sur l'activité physiologique de son tube digestif (section 4.5, page 87), ainsi que sur les variations d'expression du génome à l'échelle de l'intestin ou de l'organisme entier (section 4.6, page 97).

4.4 Étude de l'homéostasie de l'épithélium intestinal en réponse à divers stress

4.4.1 Introduction

L'épithélium intestinal de la drosophile est une monocouche de cellules entourée d'une lame basale et d'une couche de cellules musculaires viscérales. Les enterocytes sont le principal type cellulaire, et sont responsables de la captation des nutriments. Ils possèdent des microvilosités sur leur face apicale pour augmenter la surface de contact avec le milieu extérieur (Figure 1.3d, page 7). L'épithélium est séparé de la lumière intestinale par la membrane péritrophique (Figure 4.10, page 81).

L'épithélium intestinal est un tissu en contact permanent avec l'environnement extérieur, et de ce fait il endure de multiples agressions (Figure 4.11, page 82). L'homéostasie de ce tissu repose sur sa capacité de régénération en réponse aux stress subis. Des cellules souches sont présentes tout le long de l'épithélium, et peuvent se diviser de façon asymétrique pour se renouveler elles-mêmes et produire de nouvelles cellules qui remplaceront les cellules mortes. Depuis la découverte de l'existence de ces cellules en 2006 [154, 170], un grand travail a été fait pour étudier les signaux qui induisent leur division (Figure 4.12, page 82). Certaines études ont caractérisé ces cellules dans un contexte naturel ou développemental [8, 17, 48, 49, 109, 148, 155, 171, 217], et d'autres

ont rapporté leur activité en réponse à des stress, et notamment des infections bactériennes [9, 10, 33, 34, 35, 112, 113, 206].

Ces études ont notamment permis de mettre en évidence que lors d'une infection par ingestion des bactéries *Erwinia carotovora carotovora* 15 ou *Pseudomonas entomophila*, l'épithélium intestinal subit un fort taux de mort cellulaire, ce qui induit la division des cellules souches, qui assurent la maintenance de l'intégrité de l'épithélium et par conséquent la survie de l'animal en fournissant des nouvelles cellules [33, 112, 113]. Par ailleurs, il a été montré qu'une dérégulation du système immunitaire due à la perte de fonction du gène *caudal* induit la surproduction de peptides antimicrobiens, ce qui provoque un changement de composition de la communauté bactérienne intestinale dont l'émergence d'une espèce potentiellement pathogène, et induit la mort cellulaire au sein du tissu, ce qui affecte négativement la longévité de l'animal [194]. J'ai voulu savoir si, dans le mutant perte de fonction du gène *pims*, qui induit lui aussi une surproduction de peptides antimicrobiens en présence de flore intestinale, on observe le même phénomène de mort cellulaire dans l'épithélium intestinal et l'activation des cellules souches. Pour cela j'ai entamé une étude visant à caractériser l'activité des cellules souches intestinales de la drosophile, en présence et en absence de flore bactérienne, chez des individus sauvages et des mutants *pims^{Ev}*.

Il existe un outil génétique qui permet de marquer les cellules souches intestinales (ISC) en leur faisant produire la "Green Fluorescent Protein" (GFP) : le transgène *esg-gal4, uas-gfp* [154]. Les cellules souches sont diploïdes, alors que les cellules matures de l'épithélium intestinal sont polyploïdes. Le facteur de transcription Escargot est responsable du maintien de la diploïdie dans les cellules souches, et la production de la protéine GFP suite à l'expression du transgène est donc restreinte à ce type cellulaire, ainsi qu'aux entéroblastes, les jeunes cellules nouvellement issues de la division des ISC, qui sont encore immatures. L'outil permet donc de visualiser les cellules souches de manière individuelle lorsqu'elles sont quiescentes, et de voir des clones de cellules possédant la GFP lorsqu'elles se sont divisées pour produire des entéroblastes. La figure 4.13, page 83 illustre l'utilisation de cet outil génétique permettant la visualisation des cellules souches intestinales quiescentes et des clones contenant des entéroblastes.

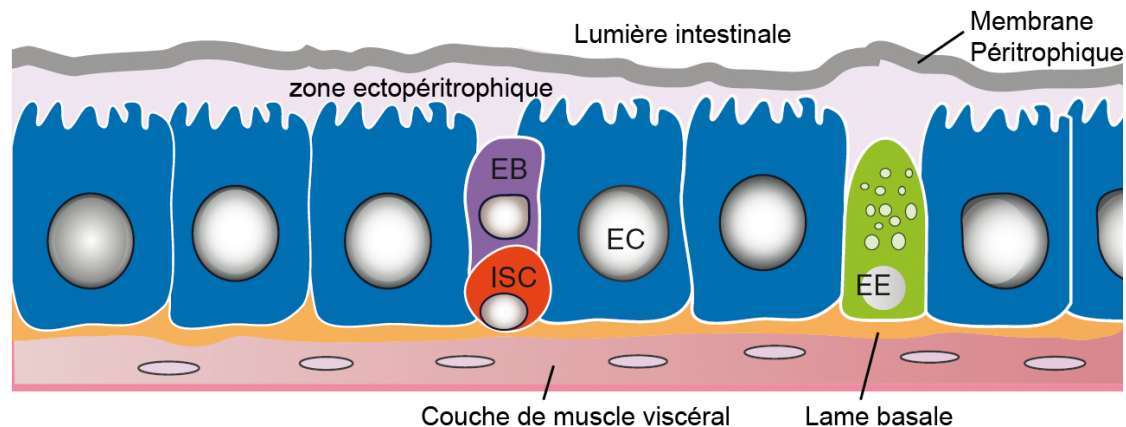


FIGURE 4.10 – L'épithélium intestinal de la drosophile

L'épithélium intestinal de la drosophile est composé à environ 90% par des enterocytes (EC), et à environ 10% par des cellules souches intestinales (ISC), les entéroblastes (EB) qui sont les cellules nouvellement issues d'une division asymétrique des ISC, et des cellules entéroendocrines (EE). Les ISC sont localisées au niveau basal, en contact avec les cellules du muscle viscéral sous-jacent. Tiré de [111].

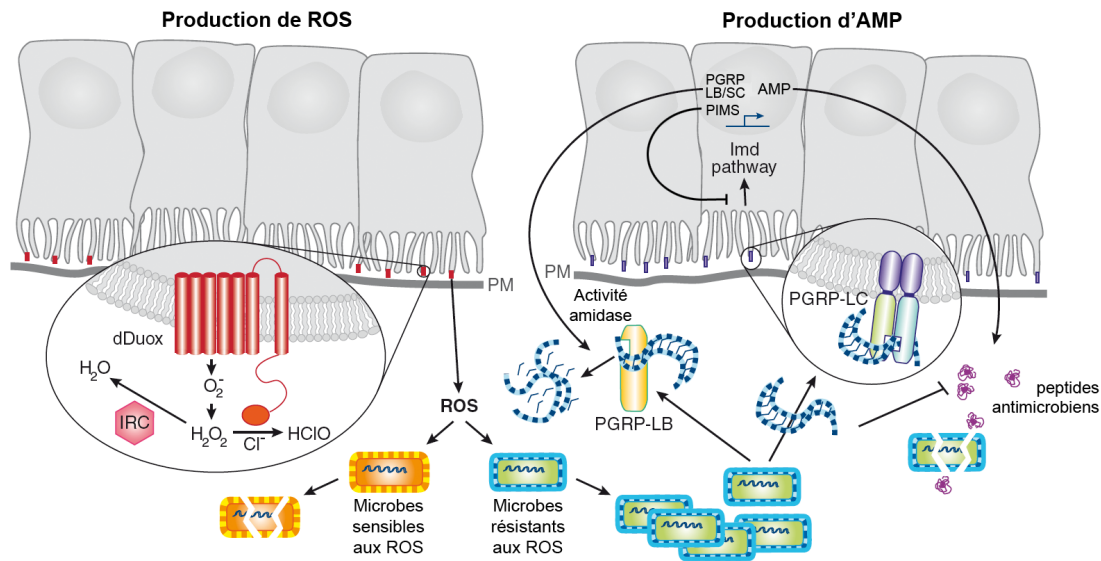


FIGURE 4.11 – Les activités immunitaires au niveau de l'épithélium intestinal

Les productions locales d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de peptides antimicrobiens (AMP) constituent deux moyens de défense contre les microorganismes. Les ROS sont produits par l'enzyme dual oxydase (dDuox) et sont éliminés par l'enzyme "Immune Responsive Catalase" (IRC). La molécule HClO est très toxique. La voie de signalisation IMD contrôle la production de peptides antimicrobiens. Les régulateurs négatifs PGRP-LB, PGRP-SC1 et Pims maintiennent la voie sous un rétro-contrôle négatif. Les PGRP amidasiques (LB, SC1) dégradent le peptidoglycane extracellulaire, alors que Pims inhibe le récepteur PGRP-LC au niveau intracellulaire. A l'intérieur des cellules, PGRP-LE active aussi la voie de signalisation IMD en fixant les monomères de peptidoglycane intracellulaires. La voie IMD active la voie p38, qui contrôle l'expression du gène *duox*. PM : membrane péritrophique. Adapté de [135].

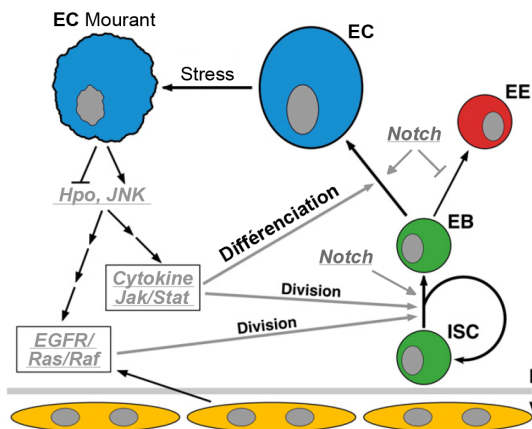


FIGURE 4.12 – Activation des Cellules Souches.

Les entérocytes (EC) qui sont stressés activent la voie de signalisation JNK et répriment la voie Hippo (Hpo), et par conséquent sécrètent des cytokines activatrices des voies EGFR (keren, spitz) et Jak/Stat (Upd, Upd3) dans les Cellules Souches Intestinales (ISC). Les cellules des muscles viscéraux (VM) produisent aussi des cytokines qui activent la voie EGFR (vein) dans les ISC. Les ISC se divisent de façon asymétrique : elles se renouvellent et produisent un entéroblaste (EB), qui se différencie sous contrôle de la voie Notch en entérocyte ou en cellule entéroendocrine (EE). BM : membrane basale. Adapté de [110].

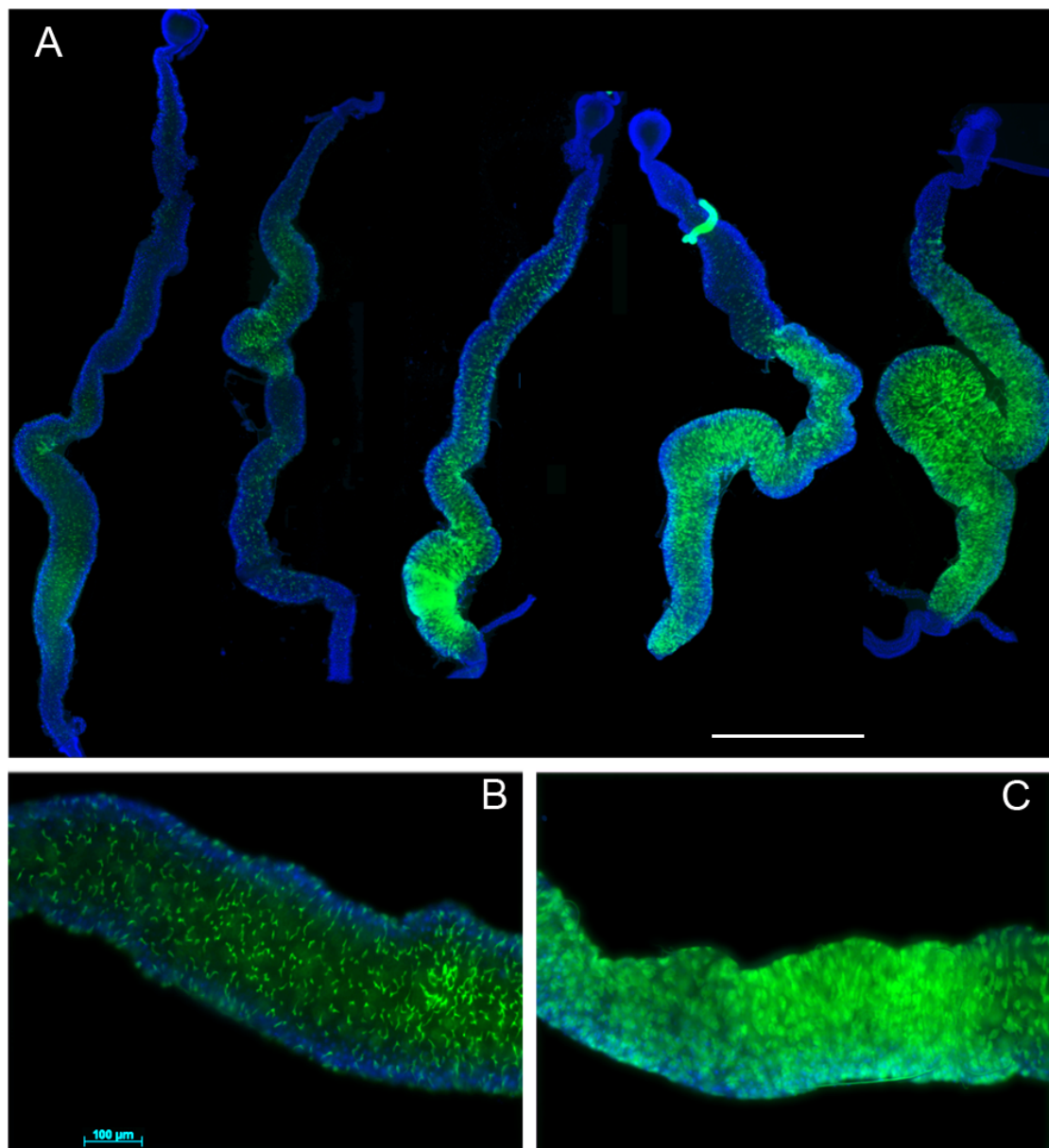
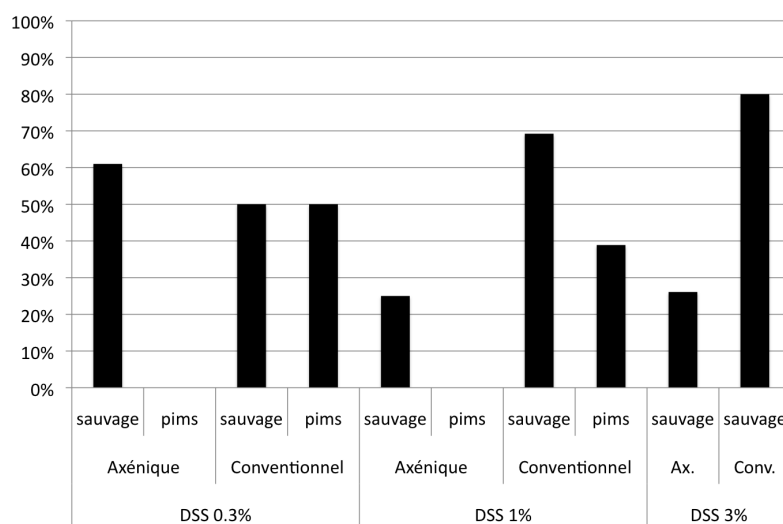
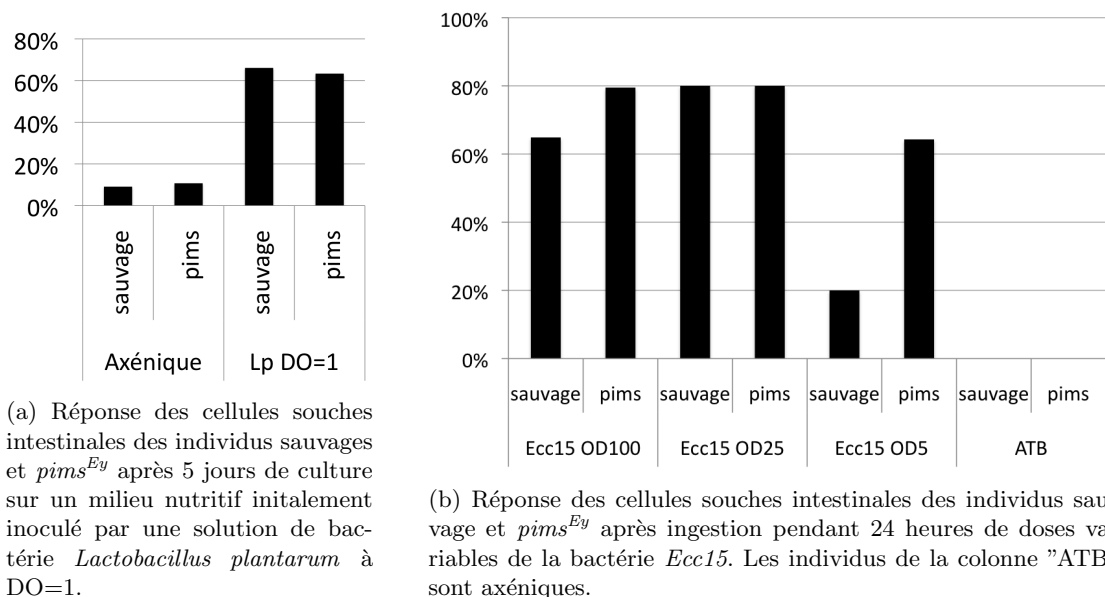


FIGURE 4.13 – Un outil génétique pour visualiser les cellules souches intestinales et les entéroblastes

La construction *esg-gal4, uas-gfp* permet de visualiser les cellules souches intestinales et les entéroblastes. Les tubes digestifs ont été disséqués de sorte à ne garder que l'intestin moyen. (A) 2 intestins moyens dont les cellules souches sont quiescentes (gauche) et 3 intestins moyens dont les cellules souches sont activées dans tout ou partie de l'épithélium (droite). (B) Cellules souches quiescentes. (C) Clones de cellules exprimant la GFP contenant des cellules souches et des entéroblastes. Bleu : DAPI (permet de visualiser l'ADN) ; Vert : GFP. Echelle : (A) 1mm, (B) et (C) 0.1mm.



(c) Réponse des cellules souches intestinales des individus sauvage et *pims^{Ey}* après 48 heures de contact avec une alimentation additionnée de DSS.

FIGURE 4.14 – Proportion d'individus présentant une activation de leur cellules souches intestinales en réponse à divers stress.

Les graphiques rapportent les proportions d'individus qui ont montré une activation de leur cellules souches intestinales dans au moins une région de l'intestin en réponse à l'ingestion de *Lactobacillus plantarum* (a), de *Erwinia carotovora carotovora 15* (b) ou de Dextran Sodium Sulfate (DSS) à diverses concentrations (c). Nombre d'individus dans chaque condition : (a) sauvages axéniques : 11, *pims^{Ey}* axéniques : 28, sauvages recolonisés : 56, *pims^{Ey}* recolonisés : 30 ; (b) sauvages *Ecc15* DO100 : 37, *pims^{Ey}* *Ecc15* DO100 : 39, Sauvages *Ecc15* DO25 : 10, *pims^{Ey}* *Ecc15* DO25 : 5, Sauvages *Ecc15* DO5 : 15, *pims^{Ey}* *Ecc15* DO5 : 14, sauvages *Ecc15* ATB : 16, *pims^{Ey}* *Ecc15* ATB : 11 ; (c) sauvages axéniques DSS 0.3% : 18, *pims^{Ey}* axéniques DSS 0.3% : 18, sauvages conventionnels DSS 0.3% : 12, *pims^{Ey}* conventionnels DSS 0.3% : 14, sauvages axéniques DSS 1% : 24, *pims^{Ey}* axéniques DSS 1% : 18, sauvages conventionnels DSS 1% : 13, *pims^{Ey}* conventionnels DSS 1% : 18, sauvages axéniques DSS 3% : 23, sauvages conventionnels DSS 3% : 25.

4.4.2 Résultats et discussion

En parallèle du travail qui a consisté à mettre au point la méthode de recolonisation des individus axéniques (section 4.3, page 76) j'avais commencé à mener quelques expérimentations pour étudier la réponse de l'épithélium intestinal à la présence de la bactérie *Lactobacillus plantarum* ainsi qu'à divers autres stress. Je l'ai étudiée chez des individus sauvages et des individus *pims^{Ey}* afin d'évaluer l'impact de la dérégulation de la voie de signalisation IMD dans ces situations. Les résultats obtenus, qui sont préliminaires, sont rassemblés dans la figure 4.14, page 84.

4.4.2.1 Réponse à l'ingestion de bactéries

Les individus axéniques, qui se sont développés sur un milieu contenant des antibiotiques et qui n'ont pas de flore microbienne dans leur tube digestif présentent un taux d'activation très faible de leur cellules souches intestinales, chez moins de 10% d'entre eux (figures 4.14a et 4.14b). Les individus sauvages répondent à une exposition de 24 heures à la bactérie *Erwinia carotovora carotovora 15* en activant leurs cellules souches intestinales lorsque la solution bactérienne utilisée est à une concentration équivalant une Densité Optique de 100 ou de 25 chez 60% à 80% d'entre eux, mais pas à une Densité Optique de 5 (figure 4.14b). Une proportion d'individus montrant une activation de leurs cellules souches intestinales à peu près équivalente est visible après 5 jours de culture sur un milieu nutritif ensemencé avec la bactérie *Lactobacillus plantarum* à une Densité Optique de 1. La présence de cette bactérie commensale provoque donc une augmentation du taux de renouvellement de l'épithélium intestinal chez les individus sauvages en comparaison du taux observé en condition axénique, ce qui est cohérent avec les données rapportées par d'autres [33].

Nous n'observons pas de différence entre les individus sauvages et *pims^{Ey}* dans la réponse de l'épithélium intestinal à la présence de *Lactobacillus plantarum* dans le milieu (Figure 4.14a). Lors d'une ingestion de la bactérie *Erwinia carotovora carotovora 15* à DO5, les individus *pims^{Ey}* activent les cellules souches intestinales de façon plus dramatique que les sauvages (Figure 4.14b). La dérégulation de la voie de signalisation IMD, via la perte de fonction du gène *pims*, rend donc l'épithélium hypersensible à la présence de cette bactérie, de sorte que l'épithélium mutant réagit fortement face à une dose de bactéries pour laquelle le sauvage réagit faiblement.

La réponse de l'épithélium à la présence de *Lactobacillus plantarum* semble aussi forte que la réponse à l'infection par *Erwinia carotovora carotovora 15*, ce qui suggère que l'ingestion d'une bactérie commensale par un individu initialement dépourvu de flore bactérienne intestinale provoque un certain stress au niveau de l'épithélium. Cependant, ce stress n'est pas différent entre individus sauvages et mutants, ce qui contraste avec l'ingestion de la bactérie *Ecc15*. Ceci suggère que le type d'espèce bactérienne qui est ingéré conditionne le type de réponse de la part de l'épithélium, où une bactérie naturellement commensale est en quelque sorte plus "discrète" vis-à-vis du système immunitaire que ne le sont les non commensales, puisqu'elles n'activent pas de réponse plus forte lorsque le système est dérégulé. Cependant, ces résultats sont préliminaires, et sont discutés dans la section suivante à la lumière de nouvelles données, publiées par l'équipe du Pr. Lemaitre [177].

4.4.2.2 Réponse à l'ingestion d'une molécule toxique

En ce qui concerne la réponse au stress provoqué par l'ingestion de *Dextran Sodium Sulfate* (DSS), une molécule cytotoxique qui provoque la mort des cellules épithéliales [9, 58], la figure 4.14c montre que l'activation des cellules souches intestinales est plus marquée chez les individus sauvages que chez les mutants *pims^{Ey}*, et que cette réponse est d'autant plus forte en présence d'une flore commensale en comparaison avec les individus axéniques. Pour évaluer les

dégats causés au sein de l'épithélium, il faudrait mesurer le taux de mort cellulaire au sein du tissu. Mais si on considère que le taux d'activation des cellules souches nous renseigne indirectement sur le niveau de dégat, alors ces observations suggèrent que la sur activation de la voie de signalisation IMD liée à la perte de fonction du gène *pims* a un effet protecteur face au stress provoqué par l'ingestion de DSS. Par contre, la flore intestinale renforce les effets délétaire de cette molécule.

L'impact négatif de la présence des bactéries lors du stress cytotoxique peut simplement être considéré comme l'effet cumulé des deux conditions : les bactéries en soi déclenchent un niveau basal de stress, provoquant un taux de mort cellulaire et d'activation des cellules souches intestinales qui est plus élevé que ce qu'on peut voir en condition axénique [33]. L'addition d'un stress supplémentaire par l'ingestion de DSS augmente d'autant plus les taux de mort cellulaire et d'activation des cellules souches.

L'ingestion de DSS provoque un stress oxydatif caractérisé par une augmentation du niveau des espèces réactives à l'oxygène [20], et les effets délétaires qu'il provoque chez la souris peuvent être diminués en assurant une meilleure détoxification de ces molécules via l'apport du gène codant une version extracellulaire de l'enzyme superoxide dismutase, impliquée dans la gestion de la balance oxidation / reduction de l'organisme [173]. Une hypothèse pour expliquer l'impact protecteur de la mutation *pims^{Ey}* durant l'ingestion de DSS chez la drosophile pourrait être liée au récent rapport qui montre que la surexpression du gène codant le peptide antimicrobien diptéricine permet une meilleure résistance aux stress oxydatifs [254]. Il a été montré que ce phénomène est dû à une augmentation de l'activité des enzymes super oxide dismutase, catalase et Glutathione-S-transférases, qui permettent d'éviter une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et assurent ainsi une meilleure balance oxidation / réduction dans l'animal, ce qui au final est responsable de l'amélioration des capacités de survie des drosophiles surexprimant le gène *dptericine* lors de stress oxydatif [253]. Etant donné que l'activité de la voie de signalisation IMD est plus forte chez les mutants *pims^{Ey}* que chez les sauvages et que la production de peptides antimicrobiens, dont la diptéricine, en est augmentée ; on peut supposer que l'effet protecteur de la perte de fonction de ce gène lors de l'ingestion de DSS est basée sur ces mécanismes.

Je rappelle encore que les quantifications présentées ici ont besoin d'être affinées par des mesures supplémentaires pour confirmer ou infirmer les tendances observées. Cependant, lors d'une communication personnelle avec l'équipe dirigée par le Pr. Bruno Lemaitre, j'ai appris qu'ils effectuaient le même genre de travaux. En tenant compte du fait qu'ils étaient plus avancés que moi dans le développement de leur projet, nous avons pris la décision de ne pas donner suite à ma démarche. Ils ont publié leurs résultats dans la revue *Immunity* en 2011 [177].

4.4.2.3 Résultats publiés par une autre équipe

Les résultats publiés par Paredes et al. [177] démontrent la nécessité de bien réguler la voie de signalisation IMD car son activité peut être délétaire pour l'organisme. En effet, les doubles mutant *PGRP-SC;PGRP-LB* ou le triple mutant *pims^{Ey};PGRP-SC;PGRP-LB* ont une durée de vie réduite après ingestion de la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15. Leur longévité est également réduite dans des conditions de culture conventionnelle, sans infection artificielle, mais peut être partiellement restaurée par une mise en culture en condition axénique. Dans les deux cas, le taux de division des cellules souches est plus élevé chez les mutants que chez les sauvages.

Ce travail n'a pas montré que c'est effectivement une surexpression des gènes cibles du facteur de transcription Relish, sous contrôle de la voie IMD, qui provoque les phénotypes observés. Or, cette voie de signalisation est connectée aux voies JNK et p38. La première contrôle directement l'activité des cellules souches intestinales, et doit être finement régulée pour assurer une longévité maximale de l'organisme [25]. La seconde déclenche l'expression du gène codant la dual oxidase,

enzyme productrice d'espèces réactives à l'oxygène destinée à contrôler la charge bactérienne de l'intestin en générant un stress oxydatif, et qui doit être correctement régulée elle aussi afin de ne pas porter atteinte à la durée de vie de l'animal [93]. Les mécanismes physiopathologiques liés à la dérégulation de la voie de signalisation IMD ne sont pas encore élucidés. Néanmoins, les observations de Paredes et al. [177] valident l'hypothèse de travail que je m'étais proposée de tester et la pertinence de la démarche qui consiste à utiliser des mutants perte de fonction de gènes codant des régulateurs négatifs de la voie IMD.

Les phénotypes observés chez les simples mutants *pims^{Ey}*, *PGRP-SC* ou *PGRP-LB* ne sont pas aussi dramatiques que ceux observés chez les double ou triple mutants. Il apparaît donc que la régulation négative de la voie de signalisation IMD est basée sur un système robuste. En effet, elle repose sur l'intervention simultanée de plusieurs acteurs, et la suppression d'un des acteurs n'est pas limitante en soi, car les autres acteurs peuvent partiellement compenser le manque. Mais la suppression de plusieurs de ces acteurs à la fois entraîne finalement un déséquilibre du système, qui peut alors porter atteinte à l'intégrité de l'épithélium intestinal, et par conséquent à l'organisme entier. Finalement, à cause de la robustesse du système de régulation de la voie IMD, je pense que je n'aurai pas été en mesure de visualiser chez le mutant *pims^{Ey}* des phénotypes aussi importants que ceux décrits par Paredes et al. [177] dans les multiples mutants.

4.4.3 Conclusion

Les résultats préliminaires que j'ai obtenus avec la bactérie *Lactobacillus plantarum* et ceux qui ont été publiés avec une flore commensale non caractérisée par Buchon et al. [33] montrent que la présence naturelle de bactéries dans l'intestin de la drosophile induit l'activation des cellules souches et le renouvellement de l'épithélium. En outre, mes résultats et ceux de Paredes et al. [177] montrent combien il est important que l'activité du système immunitaire vis-à-vis de la flore commensale soit bien régulée pour éviter qu'il ne porte lui-même atteinte à l'intégrité de l'organisme. La démarche expérimentale qui consiste à étudier les mutants de perte de fonction de gènes codant les régulateurs négatifs de la voie de signalisation IMD est pertinente, et il apparaît que le contrôle mis en place par ces multiples régulateurs est robuste, puisque que la perte de l'un d'entre eux n'est pas aussi grave que la perte simultanée de plusieurs.

Dans la suite de mon travail, j'ai voulu étudier l'impact de la présence de la flore intestinale et de l'activité du système immunitaire sur la physiologie du tube digestif. En tenant compte des données publiées par Paredes et al. [177] concernant la robustesse du système de régulation négative de la voie IMD, j'ai choisi de travailler sur des individus portant une mutation dans le gène *PGRP-LB* en plus de la mutation *pims^{Ey}*.

4.5 Analyse de la physiologie intestinale

4.5.1 Introduction

L'équipe de Irene Miguel-Aliaga¹¹ a récemment montré que la physiologie intestinale de la drosophile est influencée par le régime alimentaire de l'animal, la production d'hormones de type Insuline par le cerveau, et par des hormones sexuelles [54]. Ils ont notamment identifié un réseau de neurones qui innerve l'intestin et qui influence l'appétit de l'animal via la production du peptide dILP7 (drosophila insulin-like peptide 7), et le fait que les mécanismes de rétention d'eau reposent sur les hormones leucokine et sex peptide.

Leur travail repose sur le développement d'une méthodologie originale, qui consiste à donner aux drosophiles une nourriture supplémentée d'un indicateur de pH, et à analyser leurs déjections

11. Zoology department, Cambridge University, Cambridge, England

pour évaluer leur physiologie intestinale. Ils démontrent que la couleur des déjections, c'est à dire leur pH, qui résulte des échanges d'ions dans le tube digestif, est liée à la composition de leur régime alimentaire. Le nombre de déjection et leur taille renseigne sur la quantité de nourriture ingérée. La rétention d'eau affecte la forme et l'intensité de la couleur des déjections.

Ce type d'analyse est basée sur l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image qu'ils ont développé, et qui permet de caractériser les déjections animales. Le principe est de placer les animaux dans une boîte de pétri, puis les déjections déposées sur la surface de la boîte de pétri peuvent être numérisées à l'aide d'un scanner (voir annexe 6.3, page 134), et le logiciel permet ensuite d'analyser les images numériques.

Je me suis demandé si la flore intestinale, et l'activité du système immunitaire à l'encontre de cette flore, ont un impact sur la physiologie de l'intestin. Dans le cadre d'une collaboration avec Irene Miguel-Aliaga, j'ai passé 10 jours dans son équipe pour apprendre à mettre en place et analyser ce type d'expérience. J'ai ainsi pu appliquer cette stratégie aux questions biologiques que je me pose. J'ai étudié l'impact de la présence de la flore intestinale sur la physiologie de cet organe chez les femelles, de génotype sauvage ou *yw;pims^{Ey}/CyO;PGRP-LBΔ*. J'ai ensuite étudié l'impact d'une infection bactérienne par ingestion sur ces mêmes phénotypes. Les résultats sont présentés dans les figures 4.15 à 4.18, pages 92 à 95.

4.5.2 Résultats et discussion

Issues d'une première expérience, les figures 4.15 et 4.16, pages 92 et 93 présentent les résultats obtenus chez les individus sauvages et mutants en présence ou en absence de flore intestinale. Provenant d'une deuxième expérience, les figures 4.17 et 4.18, pages 94 et 95 montrent les résultats obtenus chez les individus sauvages et mutants en présence ou en absence d'infection intestinale par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15, dans des drosophiles qui possèdent une flore intestinale. La flore intestinale chez les individus concernés a été obtenue selon le protocole de recolonisation présenté dans la section 4.3, page 76 ; et les valeurs de charges bactériennes, mesurées à la fin de l'expérience, sont présentées en annexe dans les figures 6.5, page 137 et 6.6, page 138. Des tests statistiques ont été effectués sur l'ensemble des données collectées, et sont commentés dans l'annexe 6.8, page 139.

4.5.2.1 Impact de la présence d'une flore et d'une infection intestinale

D'une manière générale, il n'apparaît aucune différence frappante entre les individus axéniques et les individus recolonisés. Les valeurs de pH dans les déjections sont parfaitement identiques entre toutes les conditions testées (Axéniques / Recolonisés / Infectés) (figures 4.16, page 93 et 4.18, page 95). Il semblerait que les tailles des déjections soient plus grandes chez les mutants que chez les sauvages lorsqu'on regarde les résultats de la première expérience (figure 4.15c, page 92), mais cette tendance n'a pas été observée chez les individus recolonisés non infectés de la deuxième expérience (figure 4.17c, page 94). Le même commentaire peut être fait pour les formes des déjections (Acircularité). En ce qui concerne la rétention d'eau, les conditions testées n'affectent pas les individus sauvages. Par contre, les mutants semblent réagir différemment à l'infection, en produisant des déjections plus diluées, ce qui traduit une diminution de leur rétention d'eau dans cette condition.

4.5.2.2 Impact de la perte de régulateurs négatifs de la voie de signalisation IMD

Il semble que les mutants produisent moins de déjections que les sauvages, que ce soit en condition axénique, en présence de flore intestinale, et en présence d'une infection (figures 4.15a page 92 et 4.17a page 94). Cela peut supposer qu'ils ont une consommation de nourriture réduite.

Cette observation est corrélée au fait qu'en présence d'une flore, leur tube digestif a une capacité de contenance moins importante que les individus sauvages (figure 4.19, page 96). Il est remarquable que ce phénomène semble être dépendant de la présence d'une flore, d'autant plus que la charge bactérienne des mutants est plus élevée que celle des sauvages (figures 6.5, page 137 et 6.6, page 138). En outre, en réponse à une infection bactérienne les mutants diminuent la rétention d'eau et produisent des déjections plus diluées (figure 4.18b, page 95), ce qui ce n'est pas le cas en situation axénique ou en présence de flore sans infection. Il semble donc que la physiologie intestinale des mutants soit différente de celles des sauvages, ce qui peut se discerner en présence d'une flore et surtout en réponse à une infection. Cependant, ces phénotypes sont subtils et il faudrait répéter ces expériences pour en confirmer les conclusions. A titre de comparaison, j'ai inclus en annexe les graphiques présentant l'effet du régime alimentaire et du genre de l'individu sur ce critère (Annexe 6.4, page 136), qui sont cohérents avec les données publiées [54].

4.5.2.3 Les mutants consomment moins de nourriture que les sauvages

Afin de confirmer le phénotype de diminution de consommation de nourriture chez les mutants, j'ai envoyé les drosophiles à Christo Christov, dans l'équipe de Irene Miguel-Aliaga, qui a effectué une mesure directe de la consommation alimentaire de ces animaux via le test CAFE (Cappillary Feeder) [108]. Ce test, qui consiste à nourrir les insectes de manière individuelle à l'aide d'une solution nutritive contenue dans une pipette graduée, permet de mesurer avec précision le volume de nourriture ingérée au cours du temps. Christo Christov a mesuré ces valeurs sur les individus axéniques, et les résultats sont présentés dans la figure 4.20, page 96. L'expérience dure 4 jours, et la première journée est considérée comme une étape d'adaptation pour que les mouches s'habituent à se nourrir via la pipette, et n'est donc pas présentée ici. Il n'y a pas de différence entre les sauvages et les mutants au jour 1, mais les mutants se nourrissent moins pendant les jours 2 et 3. Il semble donc qu'au fur et à mesure que le temps passe, les mutants consomment moins de nourriture que les sauvages, ce qui confirme l'hypothèse initialement basée sur leur plus faible nombre de déjections.

4.5.2.4 Discussion

La perte des deux copies du gène *PGRP-LB* et d'une copie du gène *pims*, deux régulateurs négatifs de la voie de signalisation IMD, entraîne une diminution de la consommation de nourriture par les drosophiles. Chez cet animal, ce comportement est contrôlé par plusieurs hormones : l'allostatine A [101], le neuropeptide F (versions courte et longue) [131, 247], le peptide de type insuline 7 (dILP7) [54], la leucokinine [7], le peptide de la glande accessoire 70A (Acp70A) [40], mangetout [158], ovo [245], Pox neuro [158], smooth [130] et takeout [245]. De plus, la rétention d'eau est diminuée chez ces individus notamment lors d'une infection bactérienne, et dans une moindre mesure en présence de la flore intestinale. Un rôle pour l'allostatine A a été proposé dans le contrôle de la rétention d'eau [235], et il a été démontré que la leucokinine est impliquée dans ce processus [54, 227], ainsi que le peptide "sex peptide" qui est fourni à la femelle par le mâle lors de la copulation [54], les hormones diurétiques 31 et 44 [38, 52] et un récepteur à canal de potentiel transitoire (trp-like) [144]. Il serait intéressant de quantifier l'expression des gènes codant ces peptides et leurs récepteurs dans les doubles mutants, afin de vérifier si leur régulation est affectée.

Buchon et al., 2009 [35] ont étudié la réponse transcriptionnelle de la drosophile lors d'une infection par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15. Ils rapportent que les gènes impliqués dans le métabolisme sont globalement réprimés, alors que les gènes immunitaires sont activés. J'ai consulté le jeu de données qu'ils ont publié afin de voir si les gènes codant les peptides impliqués dans le contrôle de l'appétit ou la rétention d'eau sont affectés par l'infection. De tous

les gènes listés, seuls celui codant l'allostatine A et celui codant l'hormone diurétique 44 sont différentiellement régulés en réponse à l'infection, avec une augmentation de leur expression d'un facteur 1.6 pour le premier et de plus de 6 pour le second.

Zinke et al., 2002 [255] ont étudié le profil d'expression du génome de la drosophile en réponse à la privation de nourriture et à une alimentation exclusivement composée de saccharose chez la larve. Là aussi, j'ai voulu savoir si les gènes cités plus haut sont régulés par ces paramètres. Seul le gène qui code l'hormone diurétique 33 est affecté par les conditions testées par Zinke et al., et montre une augmentation de son expression d'un facteur 1.5 lorsque l'animal est nourri exclusivement de saccharose pendant 12 heures. Ces trois gènes sont donc des candidats particulièrement intéressants à tester dans nos conditions.

Des interactions entre le métabolisme et l'immunité ont été décrites. En effet, le statut métabolique de la drosophile peut influencer l'expression de gènes de l'immunité [16]. Inversement, la voie de signalisation Toll peut moduler le métabolisme de l'organisme [65]. Il semble aussi que la voie de signalisation IMD participe dans une certaine mesure à la régulation du métabolisme de l'organisme en réponse à un stress génotoxique chez la larve [119]. Mes données suggèrent qu'en absence de stress environnementaux, la voie IMD exerce une influence sur l'appétit de l'adulte, et donc probablement sur son métabolisme.

Chez les mammifères, une diarrhée peut survenir notamment en cas d'intoxication alimentaire (ingestion d'une bactérie présente dans la nourriture). Elle est par ailleurs un symptôme associée aux maladies d'inflammation chroniques de l'intestin, telle la maladie de Crohn. Ainsi, elle résulte d'une perturbation de l'équilibre intestinal, et dure généralement le temps que cet équilibre soit retrouvé. Les drosophiles mutantes de mon étude semblent souffrir d'une diarrhée en réponse à l'infection par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15. Ce mécanisme n'est peut-être que transitoire, et il serait intéressant d'observer ces individus sur une période de temps plus longue que les 60 heures pratiquées ici pour voir si elle reviennent finalement à une situation normale. Elles essaient peut-être simplement de se débarrasser de la bactérie infectieuse, ce qui leur prend visiblement plus de temps que les sauvages, puisque leur charge bactérienne est plus élevée (figure 6.6, page 138).

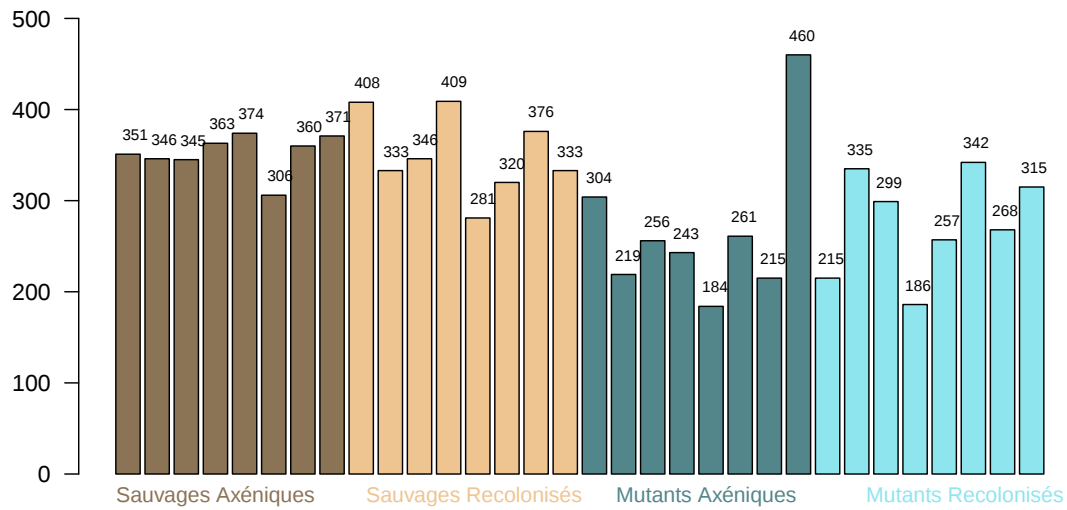
4.5.3 Conclusion

Les données publiées par Paredes et al. [177] montrent clairement que la perte de régulation de l'activité de la voie IMD est délétaire pour l'épithélium intestinal en présence d'une flore commensale naturellement acquise, et l'est d'autant plus en situation d'infection bactérienne. A cause de la perte de l'intégrité de l'épithélium intestinal, on peut imaginer que ce tissu ne fonctionne plus correctement, et que la physiologie intestinale est perturbée.

Le travail que j'ai effectué, en collaboration avec l'équipe d'Irene Miguel-Aliaga, semble indiquer que les mutants de régulateurs négatifs de la voie IMD se nourrissent moins que les sauvages, et réagissent différemment aux infections, en laissant passer plus d'eau dans leur déjection. L'hypothèse de travail est donc valide et mérite d'être encore explorée. Le système expérimental qui consiste à analyser les déjections des drosophiles s'est révélé utile. Cependant, on ne peut garantir que les événements qui se produisent dans l'intestin moyen ne soient pas partiellement masqués par ceux qui se produisent dans la partie la plus postérieure du tube digestif, auquel cas ils passent inaperçus dans ce type d'analyse. Par exemple, les échanges d'ions qui se produisent dans les tubules de Malpighi affectent le pH du matériel qui arrive dans le colon. Ce risque suggère le besoin de poursuivre ces études par d'autres moyens.

Il serait intéressant de compléter ces travaux par des études biochimiques et moléculaires. Par exemple, en menant une caractérisation du contenu des déjections par spectrométrie de masse afin d'en déterminer la composition moléculaire, ce qui renseignerait sur les activités

enzymatiques de la flore intestinale et des enterocytes concernant la digestion des nutriments. Nous pourrions développer la même stratégie sur l'hémolymph des drosophiles, afin de voir à quel point l'animal parvient à assimiler les ressources nutritives qu'il ingère. Pour voir comment son métabolisme est affecté, une analyse du contenu en matière grasse des cellules du corps gras, l'équivalent fonctionnel du foie des mammifères, pourrait être envisagée; et l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation des voies métaboliques ainsi que des neuropeptides impliqués dans le contrôle de l'appétit et la rétention d'eau pourrait être quantifiée par des réactions de polymérisation en chaîne quantitatives.



(a) Nombre de déjections dans les 8 réplicats de chaque condition.

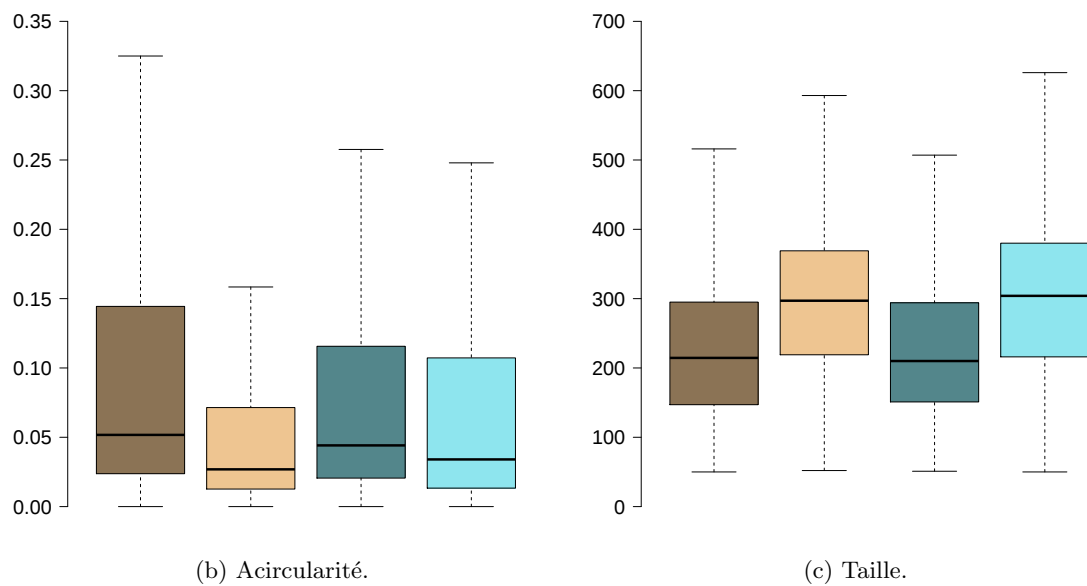
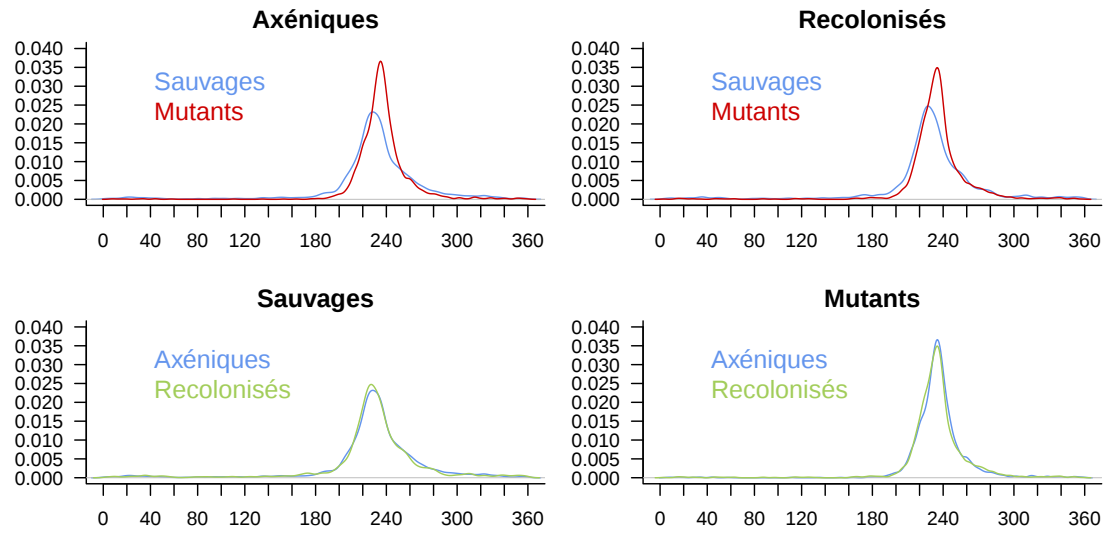


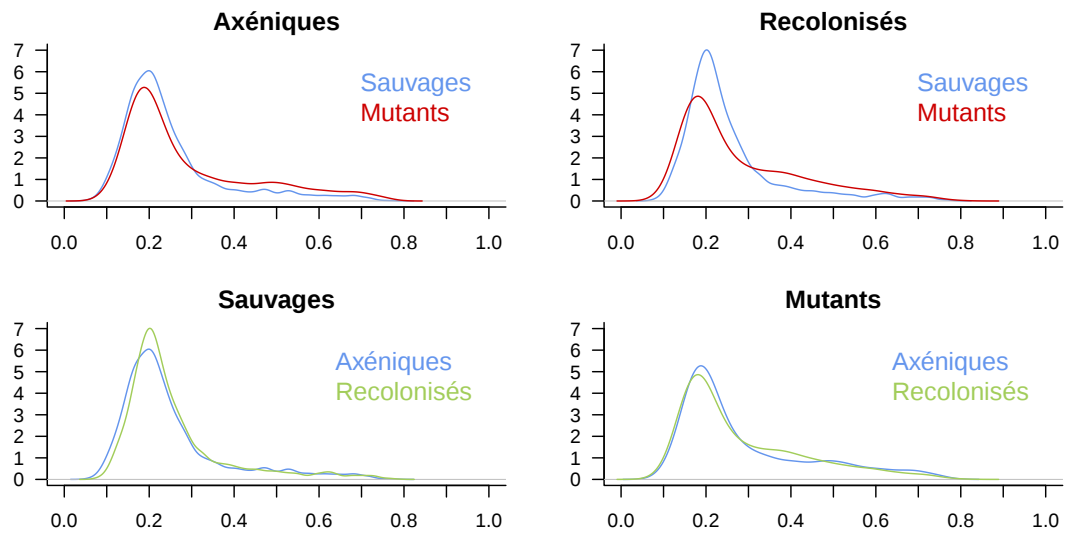
FIGURE 4.15 – Nombre, acircularité et taille des déjections des drosophiles en présence ou absence de flore intestinale.

(a) Nombre de déjections dans chaque condition. Il y a 8 réplicats par condition. Les nombres sont indiqués au dessus des barres pour chaque réplicat. (b) Acircularité des déjections dans chaque conditions. Une forme dont l'acircularité vaut 0 est un cercle parfait. Celle dont l'acircularité vaut 1 est une droite. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. (c) Taille (ou surface, en pixels) des déjections dans chaque conditions. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. (b) et (c) Les boîtes contiennent 50% des mesures. 25% des mesures ont une valeur inférieure à l'extrémité inférieure de la boîte, et 25% des mesures ont une valeur supérieure à l'extrémité supérieure de la boîte. Les projections en pointillés s'étendent jusqu'à 1.5 fois la variance de la distribution des données. La barre horizontale à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane (50% des valeurs sont situées au dessus, et 50% sont situées en dessous).

Code couleur : Marron foncé : Sauvages axéniques, Marron clair : Sauvages Recolonisés, Bleu foncé : Mutants Axéniques, Bleu clair : Mutants Recolonisés.



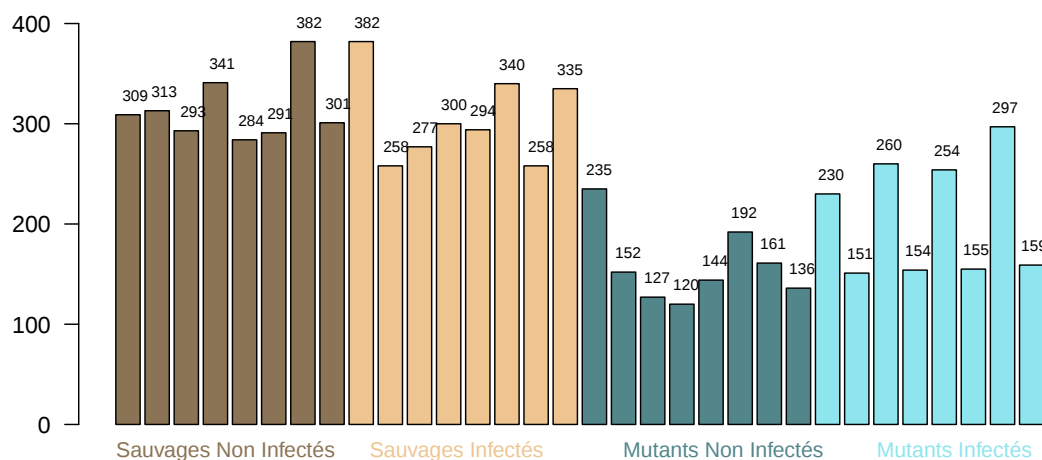
(a) Densité de distribution des valeurs de couleur moyenne dans chaque condition.



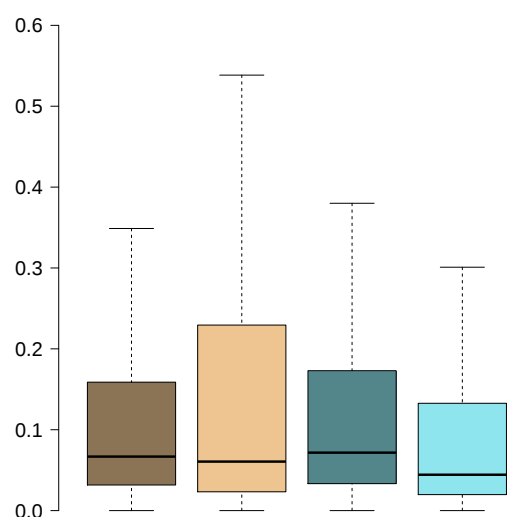
(b) Densité de distribution des valeurs de luminance moyenne dans chaque condition.

FIGURE 4.16 – Densités de distribution des valeurs de couleur et de luminance des déjections des drosophiles en présence ou absence de flore intestinale.

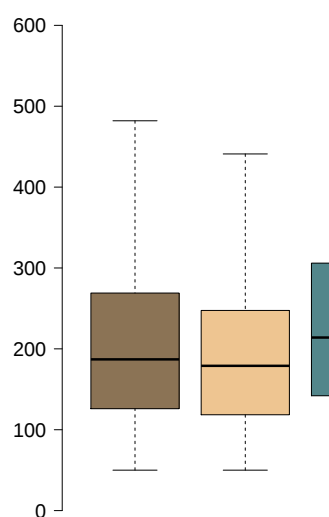
(a) Densité de distribution des valeurs de couleur moyenne de chaque déjection dans chaque condition. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. Les valeurs de couleur varient entre 0 et 360 selon le modèle de couleur TSL (voir annexe 6.4, page 135). (b) Densité de distribution des valeurs de luminance moyenne de chaque déjection dans chaque condition. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. Les valeurs de luminance varient entre 0 (noir) et 1 (blanc).



(a) Nombre de déjections dans les 8 réplicats de chaque condition.



(b) Acircularité.

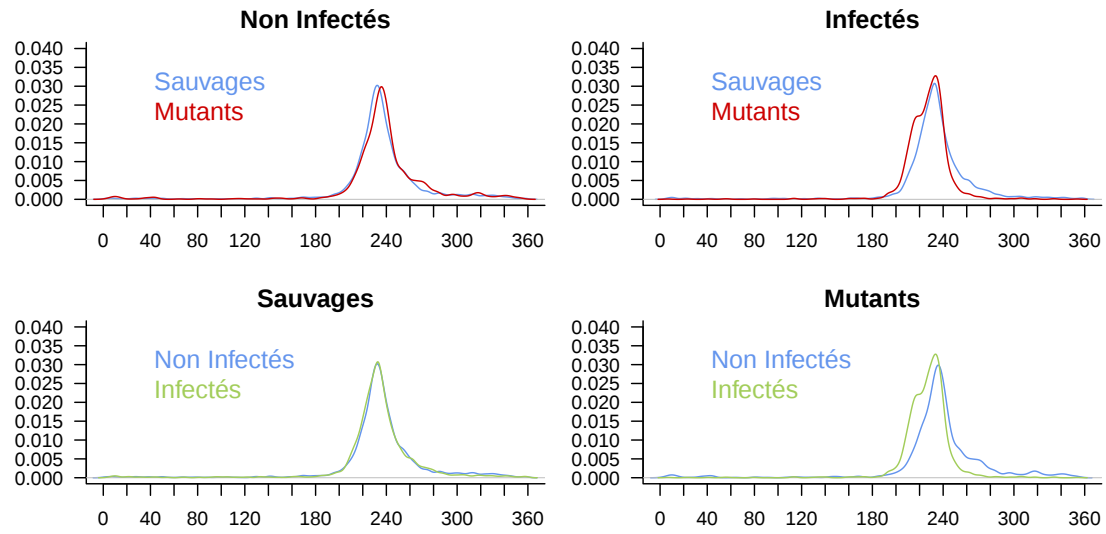


(c) Taille.

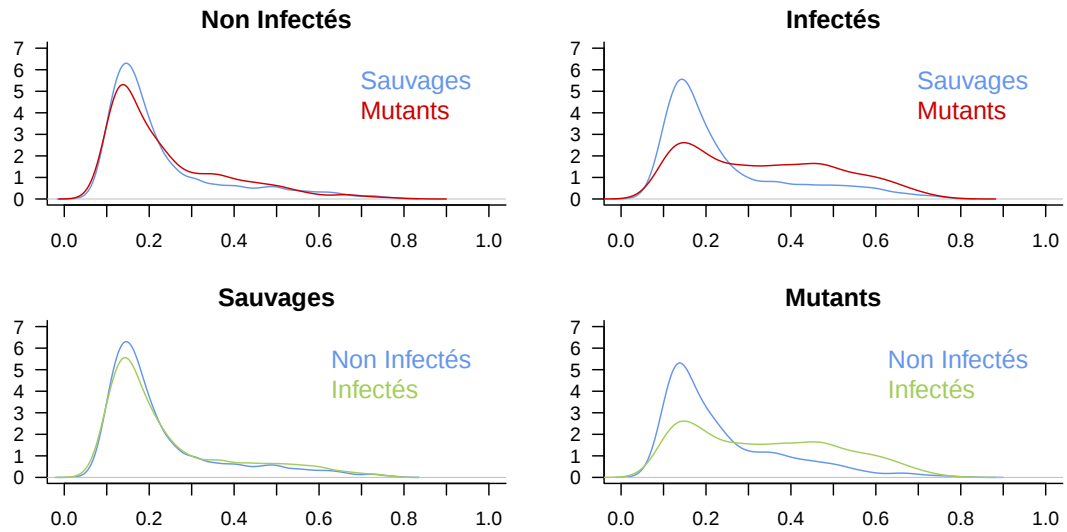
FIGURE 4.17 – Nombre, acircularité et taille des déjections des drosophiles en présence ou absence d'infection intestinale.

(a) Nombre de déjections dans chaque condition. Il y a 8 réplicats par condition. Les nombres sont indiqués au dessus des barres pour chaque réplicat. (b) Acircularité des déjections dans chaque conditions. Une forme dont l'acircularité vaut 0 est un cercle parfait. Celle dont l'acircularité vaut 1 est une droite. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. (c) Taille (ou surface, en pixels) des déjections dans chaque conditions. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. (b) et (c) Les boîtes contiennent 50% des mesures. 25% des mesures ont une valeur inférieure à l'extrémité inférieure de la boîte, et 25% des mesures ont une valeur supérieure à l'extrémité supérieure de la boîte. Les projections en pointillés s'étendent jusqu'à 1.5 fois la variance de la distribution des données. La barre horizontale à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane (50% des valeurs sont situées au dessus, et 50% sont situées en dessous).

Code couleur : Marron foncé : Sauvages Non Infectés, Marron clair : Sauvages Infectés, Bleu foncé : Mutants Non Infectés, Bleu clair : Mutants Infectés.



(a) Densité de distribution des valeurs de couleur moyenne dans chaque condition.



(b) Densité de distribution des valeurs de luminance moyenne dans chaque condition.

FIGURE 4.18 – Densités de distribution des valeurs de couleur et de luminance des déjections des drosophiles en présence ou absence d'infection intestinale.

(a) Densité de distribution des valeurs de couleur moyenne de chaque déjection dans chaque condition. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. Les valeurs de couleur varient entre 0 et 360 selon le modèle de couleur TSL (voir annexe 6.4, page 135). (b) Densité de distribution des valeurs de luminance moyenne de chaque déjection dans chaque condition. Les données issues des 8 réplicats ont été rassemblées. Les valeurs de luminance varient entre 0 (noir) et 1 (blanc).

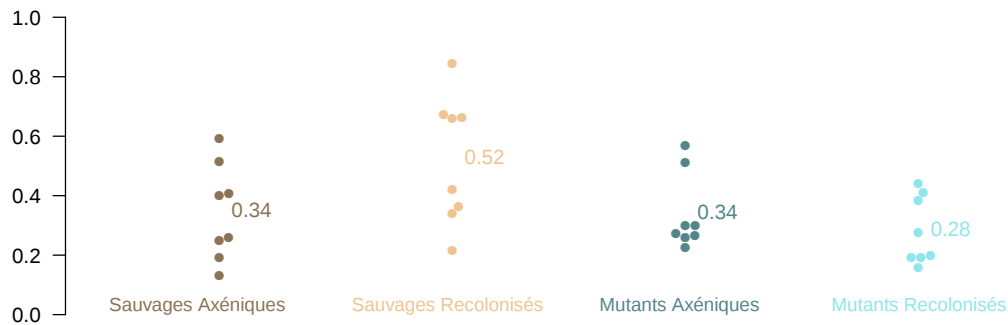


FIGURE 4.19 – Capacité de contenance de nourriture des individus sauvages et mutants, en présence ou en absence de flore.

A la fin de la période d'incubation des drosophiles dans le cadre de l'expérience présentées dans les figures 4.15 et 4.16, certaines d'entre elles ont été récupérées et broyées, puis l'absorbance du broyat a été mesurée à 594nm. Les valeurs d'absorbances sont présentées ici. Une plus forte absorbance est considérée comme provenant d'une plus grande quantité d'indicateur de pH contenu dans les drosophiles, et donc d'une plus grande quantité de nourriture dans leur organisme. Les valeurs numériques reportées sur le graphiques indiquent les moyennes des 8 réplicats pour chaque condition.

Les p-values issues du test de Wilcoxon sont : Sauvages - Mutants (Recolonisés) : $p=0.02813$, Sauvages - Mutants (Axéniques) : $p=0.8335$, Axéniques - Recolonisés (Sauvages) : $p=0.1049$, Axéniques - Recolonisés (Mutants) : $p=0.3282$.

Code couleur : Marron foncé : Sauvages axéniques, Marron clair : Sauvages Recolonisés, Bleu foncé : Mutants Axéniques, Bleu clair : Mutants Recolonisés.

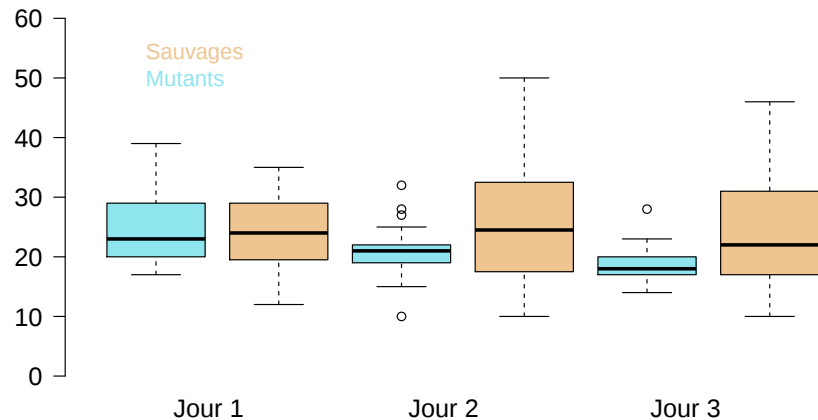


FIGURE 4.20 – Consommation alimentaire des individus axéniques sauvages et mutants.

En ordonnée sont représentés les mesures de nourriture ingéré par les drosophiles. Les données issues des 24 réplicats de chaque génotype ont été rassemblées (voir la section 2.11 page 29 du chapitre Matériels et Méthodes). Les boîtes contiennent 50% des mesures. 25% des mesures ont une valeur inférieure à l'extrémité inférieure de la boîte, et 25% des mesures ont une valeur supérieure à l'extrémité supérieure de la boîte. Les projections en pointillés s'étendent jusqu'à 1.5 fois la variance de la distribution des données. La barre horizontale à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane (50% des valeurs sont situées au dessus, et 50% sont situées en dessous). La p-value issue du test de Wilcoxon sur les 3 jours est de 0.03773.

Code couleur : Marron : Sauvages, Bleu : Mutants.

4.6 Analyse du transcriptome

4.6.1 Introduction

Les études de l'impact de la présence de la flore bactérienne intestinale et de l'activité du système immunitaire présentées dans les sections précédentes étaient basées sur des hypothèses que je voulais tester. Dans cette dernière partie de mon travail de thèse, j'ai voulu aborder ces mêmes questions de façon naïve, donc sans hypothèse *a priori*, et à large échelle. L'objectif est de déterminer les éventuels impacts d'une présence bactérienne sur l'activité transcriptomique de la drosophile, et de voir si le système immunitaire, par l'intermédiaire de la voie de signalisation IMD, influence des processus autres que l'immunité. Pour cela j'ai mené une analyse de l'activité transcriptomique du génome de la drosophile en présence ou en absence de flore, avec ou sans dérégulation de la voie de signalisation IMD. Je l'ai menée à la fois sur l'organisme entier et sur l'intestin isolé pour évaluer les influences respectivement locales et systémiques de la flore bactérienne et du système immunitaire. Etant donné que ce travail a été initié avant que les conclusions des travaux présentés dans la section 4.4 sur l'étude de l'homéostasie de l'épithélium intestinal ne soient tirées, j'ai utilisé le mutant *pims^{Ey}* et non pas un double ou triple mutant des régulateurs négatifs de la voie de signalisation IMD. Les détails de la procédure sont précisés dans la section 2.12, page 29 ; cependant je tiens à préciser ici que les données ont été produites et normalisées par une plate-forme spécialisée de l'institut Curie¹² et que l'analyse statistique des données a été faite en collaboration avec le Pr. Pascal Rihet et le Dr. Denis Puthier du laboratoire TAGC¹³.

4.6.2 Méthodologie

L'analyse transcriptomique permet d'établir des listes de gènes dont l'expression varie en fonction de l'état des facteurs considérés. Une fois ces listes de gènes obtenues, l'objectif est de voir si elles comportent un enrichissement en gènes qui sont impliqués dans un processus biologique particulier. C'est à dire que je souhaite savoir si une liste contient une proportion différente de gènes impliqués dans chaque processus biologique représenté que les proportions de ces mêmes processus dans le génome entier. En outre, il peut être intéressant de savoir si les gènes contenus dans une listes sont préférentiellement exprimés dans un tissu particulier. En l'occurrence, dans les analyses de transcriptomes effectuées sur les drosophiles entières, on peut se demander si les gènes dérégulés sont exprimés dans un même tissu, auquel cas on pourrait éventuellement détecter un enrichissement dans la liste pour des gènes exprimés dans ce tissu par rapport à la proportion de ce type de gènes dans le génome.

Le projet "Gene Ontology"¹⁴ répertorie et classe un certain nombre de termes permettant de décrire les produits des gènes de n'importe quel génome séquencé. Il fournit des termes pour décrire le ou les processus biologiques dans lesquels est impliqué un gène, les fonctions moléculaires exécutées par le produit de ce gène, et les compartiments cellulaires dans lesquels le produit de ce gène est retrouvé. Chaque information concernant un gène est donnée sur la base d'une observation directe faite par un expérimentateur qui en a rapporté les conclusions, ou bien sur la base d'une prédiction bioinformatique issue de l'analyse des séquences codantes du gène. Le projet Gene Ontology permet donc de tenter d'attribuer à chaque gène d'un génome séquencé une ou plusieurs étiquettes pour ces 3 catégories d'informations, et d'avoir ainsi une vue d'ensemble des processus biologiques, fonctions moléculaires ou compartiments cellulaires dans

12. Plate-forme Affymetrix de biologie moléculaire de l'institut Curie, Paris.

13. Laboratoire TAGC / INSERM U1090, Avancées Technologiques en Génomique et en Clinique, Parc Scientifique de Luminy case 928, 163 avenue de Luminy, MARSEILLE cedex 09, 13288 France

14. [http ://www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/)

lesquels sont impliqués les gènes contenus dans une liste. J'ai utilisé l'outil en ligne DAVID¹⁵ [104] pour obtenir ces informations à propos de mes listes de gènes.

Le site Internet FlyMine¹⁶ [142], qui utilise la banque de données du site FlyAtlas¹⁷ [45], permet de voir si une liste de gènes présente un enrichissement en gènes exprimés dans un tissu particulier par rapport à la proportion de gènes du génome qui sont exprimés dans ce tissu. J'ai utilisé cet outil pour analyser mes listes de gènes.

4.6.3 Résultats

4.6.3.1 Listes de gènes dérégulés en réponse aux variations d'état des paramètres expérimentaux

Dans mon étude, l'analyse du transcriptome a été faite en faisant varier deux facteurs : la présence ou l'absence de la flore microbienne d'une part, et le génotype sauvage ou mutant de la drosophile pour le gène *pims* d'autre part (voir la section 2.12, page 29 du chapitre Matériels et Méthodes). Les gènes qui sont dérégulés par ces facteurs peuvent être catégorisés en deux groupes : ceux qui répondent uniquement à l'un des deux facteurs, et ceux qui répondent aux deux facteurs. Les caractéristiques des listes de gènes qui sont dérégulés en réponse à un seul des deux facteurs sont regroupées dans la table 4.5, page 99 et les gènes présents dans chaque liste sont présentés en annexe dans les tables 6.3 à 6.6, pages 161 à 192. Les gènes qui répondent aux deux facteurs peuvent être divisés en deux catégories : ceux qui répondent de la même façon aux deux facteurs, et ceux qui y répondent de façon opposée. Les caractéristiques de ces listes de gènes sont présentées dans les tables 4.6, page 100 et 4.7, page 101. L'ensemble des gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur est présenté en annexe, dans la table 6.1, page 152.

Listes des gènes dérégulés en réponse à un seul facteur

Les résultats résumés dans la table 4.5, page 99 indiquent que trois des huit listes de gènes établies présentent un enrichissement pour un terme particulier de type "Processus Biologique" de Gene Ontology. La liste des gènes induits en présence de la flore dans la mouche entière est enrichie en gène portant des termes relatifs au métabolisme des protéines ou au métabolisme des sucres. Ceci indique que la flore commensale bactérienne exerce une influence sur le métabolisme de son hôte. Ces données font écho au fait qu'une infection bactérienne intestinale provoque une diminution des activités métaboliques de la drosophile, et augmente celles de son système immunitaire [35]. Elles sont aussi cohérentes avec les récents travaux effectués chez les mammifères qui ont montré l'impact de la flore intestinale sur la capacité de son hôte à extraire l'énergie contenue dans son alimentation [230]. De plus, cette liste de gènes est enrichie en gènes exprimés principalement dans l'intestin moyen (Table 4.5, page 99). Cependant, seulement 8 gènes qui sont induits par la présence de la flore dans la mouche entière sont également retrouvés comme étant induit par la flore dans l'intestin moyen (Figure 4.21, page 99). Parmi ces 8 gènes, 6 sont impliqués dans le métabolisme des sucres ou des protéines, 1 est impliqué dans le métabolisme de la sphingomyéline (un composant lipidique de la membrane cellulaire) et 1 est impliqué dans l'immunité (Table 6.7, page 193).

La flore commensale exerce aussi un impact au niveau local, dans l'intestin. En effet, il y a dans la liste des gènes réprimés dans l'intestin en présence de la flore un enrichissement en gènes auxquels sont associés des termes qui décrivent des processus développementaux (table 4.5,

15. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

16. <http://www.flymine.org/>

17. <http://130.209.54.32/atlas/atlas.cgi>

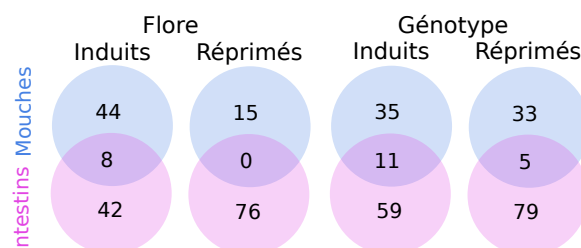


FIGURE 4.21 – Nombre de gènes dérégulés dans la mouche entière, l'intestin, et les deux tissus. Les tables 6.7 à 6.9 pages 193 à 194 donnent le détail des gènes communs aux deux types de tissu.

page 99). Parmi eux sont trouvés des gènes cibles de l'ecdysone, et la voie de signalisation de l'insuline (Table 6.4 page 172).

Le génotype de l'hôte quant à lui, en ce qui concerne la régulation de l'activité de la voie de signalisation IMD par le gène *pims*, influence principalement l'expression de gènes liés à l'immunité. Il ne semble pas y avoir d'autre impact lié à la dérégulation de la voie de signalisation IMD. Parmi les gènes qui sont induits dans la mouche entière, 11 sont également induits dans l'intestin moyen (Figure 4.21, page 99). Cependant, la majorité de ces gènes ne sont pas impliqués dans l'immunité : c'est le cas pour un seul d'entre eux (Edin) ; les autres gènes sont impliqués dans le métabolisme (2 gènes), la respiration (1 gène), la signalisation (1 gène) ou n'ont pas de terme de Gene Ontology associé (5 gènes) (Table 6.8 page 194). Cette observation s'explique par le fait que la majorité de ces gènes répondent à la fois à la présence de la flore intestinale et à la dérégulation de la voie de signalisation IMD, et sont donc principalement retrouvés dans les listes de gènes qui répondent aux deux facteurs (voir ci-dessous).

Régulation	Gènes	ND	Terme GO BP	Tissu
↑Flore Mouches	52	16	Métabolisme (Protéines, Sucres)	Intestin (Larve, Adulte)
↑Flore Intestins	50	20	<i>Aucun terme significatif</i>	-
↑Génotype Mouches	45	20	<i>Aucun terme significatif</i>	<i>Aucun tissu dominant</i>
↑Génotype Intestins	70	30	Immunité	-
↓Flore Mouches	15	6	<i>Aucun terme significatif</i>	<i>Trop peu de gènes</i>
↓Flore Intestins	76	25	Processus développementaux	-
↓Génotype Mouches	38	12	<i>Aucun terme significatif</i>	Intestin (Larve, Adulte)
↓Génotype Intestins	84	31	<i>Aucun terme significatif</i>	-

TABLE 4.5 – Caractéristiques des listes de gènes qui répondent à un seul facteur. Les listes de gènes présentées ici contiennent les gènes qui répondent uniquement au facteur considéré, et pas ceux qui répondent aux deux facteurs. La liste de gènes considérée est indiquée dans la colonne "Régulation", le nombre de gènes qu'elle contient est indiqué dans la colonne "Gènes" et le nombre de gènes de la liste pour lesquels aucun terme "Processus Biologique" de Gene Ontology n'a été attribué est indiqué dans la colonne "ND". Si la liste présente un enrichissement en gènes possédant un terme "Processus Biologique" particulier, il est indiqué dans la colonne "Terme GO BP". Les détails des résultats obtenus avec DAVID sont présentés dans la table 6.18, page 206. Si la liste présente un enrichissement en gènes exprimés dans un tissu particulier, il est indiqué dans la colonne "Tissu". Pour connaître le détail du contenu des listes, voir en annexe les tables 6.3 à 6.6, pages 161 à 192.

Listes des gènes dérégulés en réponse aux deux facteurs

Les listes de gènes qui répondent de la même manière aux deux facteurs sont présentées dans la table 4.6, page 100. Ces listes contiennent moins de gènes que dans le cas des gènes qui ne répondent qu'à un seul facteur, mais on retrouve les mêmes termes de Gene Ontology. En effet, la liste des gènes induits dans la mouche entière par la présence de la flore ou par la mutation *pims^{Ey}* est enrichie en gènes impliqués dans le métabolisme des protéines, avec un enrichissement en gènes dont l'expression est principalement dans l'intestin ; et celle des gènes induits dans l'intestin en réponse à ces deux facteurs est enrichie en gènes impliqués dans l'immunité. Six gènes sont induits par les deux facteurs à la fois dans la mouche entière et dans l'intestin, dont 2 sont impliqués dans l'immunité, 1 dans la transduction de signal, et 3 n'ont pas de terme de Processus Biologique de Gene Ontology qui leur soit associé (Table 6.12, page 199). Un gène parmi ces derniers possède une activité d'inhibition de protéase à sérine, or ce type d'activité moléculaire a été décrit pour d'autres gènes comme impliqué dans l'activation du système immunitaire [188] ; ce qui suggère que ce gène est peut-être lui aussi impliqué dans l'immunité. Il est remarquable de constater ici que des gènes portant le terme de processus biologique de Gene Ontology "protéolyse" soient activés par une dérégulation de la voie de signalisation IMD, et rejoint les précédentes observations présentées dans la section 4.5 concernant l'étude de la physiologie intestinale qui suggère que le système immunitaire peut avoir une influence sur les activités métaboliques de son hôte. En contraste avec les listes de gènes induits, il y a très peu de gènes qui sont réprimés à la fois par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}*.

Les listes de gènes qui répondent de manière opposée aux deux facteurs sont présentées dans la table 4.7, page 101. Ces listes contiennent environ le même nombre de gènes que les listes de gènes qui répondent de la même manière aux deux facteurs. La liste qui présente les gènes activés par la présence de la flore et réprimés par la mutation *pims^{Ey}* dans la mouche entière est enrichie en gènes codant des protéases, et dont l'expression est préférentiellement marquée dans l'intestin. La liste des gènes qui ont le même type d'expression dans l'intestin est enrichie en gènes impliqués dans des processus développementaux. Les listes de gènes réprimés par la flore et induits par la mutation *pims^{Ey}* contiennent très peu de gènes.

Régulation	Gènes	ND	Terme GO BP	Tissu
↑Mouches	25	7	Protéolyse	Intestin (Larve, Adulte)
↑Intestins	31	13	Immunité	-
↓Mouches	2	2	-	-
↓Intestins	5	3	-	-

TABLE 4.6 – Caractéristiques des listes de gènes communs aux facteurs Flore et Génotype qui répondent de la même façon aux deux facteurs.

Les listes de gènes présentées ici contiennent uniquement les gènes qui répondent aux deux facteurs, en y répondant de la même manière. La liste de gènes considérée est indiquée dans la colonne "Régulation", le nombre de gènes qu'elle contient est indiqué dans la colonne "Gènes" et le nombre de gènes de la liste pour lesquels aucun terme "Processus Biologique" de Gene Ontology n'a été attribué est indiqué dans la colonne "ND". Si la liste présente un enrichissement en gènes possédant un terme "Processus Biologique" particulier, il est indiqué dans la colonne "Terme GO BP". Si la liste présente un enrichissement en gènes exprimés dans un tissu particulier, il est indiqué dans la colonne "Tissu". Le détail des gènes contenus dans ces listes est présenté dans les tables 6.10 à 6.14, pages 196 à 200.

Régulation	Gènes	ND	Terme GO BP	Tissu
Mouches ↑Flore & ↓Génotype	26	10	Protéolyse	Intestin (Larve, Adulte)
Intestins ↑Flore & ↓Génotype	20	5	Processus Développementaux	-
Mouches ↓Flore & ↑Génotype	0	0	-	-
Intestins ↓Flore & ↑Génotype	5	2	-	-

TABLE 4.7 – Caractéristiques des listes de gènes communs aux facteurs Flore et Génotype qui répondent de façon opposée aux deux facteurs.

Les listes de gènes présentées ici contiennent uniquement les gènes qui répondent aux deux facteurs, en y répondant d'une manière opposée. La liste de gènes considérée est indiquée dans la colonne "Régulation", le nombre de gènes qu'elle contient est indiqué dans la colonne "Gènes" et le nombre de gènes de la liste pour lesquels aucun terme "Processus Biologique" de Gene Ontology n'a été attribué est indiqué dans la colonne "ND". Si la liste présente un enrichissement en gènes possédant un terme "Processus Biologique" particulier, il est indiqué dans la colonne "Terme GO BP". Si la liste présente un enrichissement en gènes exprimés dans un tissu particulier, il est indiqué dans la colonne "Tissu". Le détail des gènes contenus dans ces listes est présenté dans les tables 6.15 à 6.17, pages 202 à 205.

4.6.3.2 Identification de facteurs de transcription potentiellement associés aux gènes dérégulés

Les résultats résumés dans la table 4.5, page 99 indiquent que trois des huit listes de gènes établies présentent un enrichissement pour un terme particulier de type "Processus Biologique" de Gene Ontology. Ces trois listes de gènes ont donc retenu mon attention, et j'ai voulu savoir si les gènes qu'elles contiennent sont soumis à une régulation par un facteur de transcription commun.

Les gènes rassemblés dans une liste ont la même réponse transcriptionnelle face à un stimulus donné (variation de l'état de l'un des facteurs considérés). Il est donc envisageable que ces gènes soient régulés par un (ou plusieurs) facteur(s) de transcription commun(s). Si c'est effectivement le cas, on devrait pouvoir trouver des séquences régulatrices communes à ces gènes, par exemple des sites de fixation reconnus par certains facteurs de transcription. Afin de vérifier cette hypothèse, et identifier les éventuels facteurs de transcription putatifs associés à mes listes de gènes, j'ai entamé une collaboration avec Delphine Potier¹⁸ qui a utilisé l'outil CisTargetX¹⁹ [3] pour analyser les séquences régulatrices des gènes identifiés dans mes listes, et rechercher un enrichissement en présence de motifs connus pour être des sites de fixation à des facteurs de transcription. Par cette approche, Delphine Potier a identifié 3 facteurs de transcription candidats, qui sont potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression des 3 listes de gènes qui m'intéressent le plus. Ces informations, ainsi qu'un récapitulatif synthétique des données issues de l'analyse transcriptomique, sont présentées dans le tableau 4.8, page 102.

Un premier constat est le fait que l'outil informatique utilisé identifie le facteur de transcription Relish comme candidat potentiel pour réguler les gènes dont l'expression est induite dans l'intestin par la mutation *pims^{Ey}*. Or, nous savons déjà que ce facteur de transcription, sous contrôle de la voie de signalisation IMD, est effectivement impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes de l'immunité, ce qui constitue une preuve de principe que la méthode d'identification des candidats employée par le logiciel est efficace.

Le facteur de transcription GATAe est retenu comme candidat pour expliquer la régulation

18. Stein Aerts Laboratory of Computational Biology, Department of Human Genetics, KULeuven, Herestraat 49, PO Box 602, 3000 LEUVEN, Belgium

19. <http://med.kuleuven.be/cme-mg/lng/cisTargetX/>

commune des gènes induits par la flore dans la mouche entière. Il est exprimé dans l'intestin durant la vie larvaire et l'est également de façon continue chez l'adulte, où il assure l'expression de marqueurs spécifiques de cet organe [174, 175]. Etant donné le fait que cette liste présente un enrichissement en gène dont l'expression est forte dans l'intestin, ce facteur de transcription est bon candidat pour réguler l'expression des gènes de cette liste. Il a aussi été décrit comme impliqué de manière spécifique dans l'intestin chez la larve pour réguler l'activité transcriptionnelle de peptides antimicrobiens, ce qui assure un niveau basal d'expression de ces gènes dans une zone naturellement en contact avec les bactéries, indépendamment des voies de signalisation Toll ou IMD [202].

Le facteur de transcription Mad est proposé comme responsable de la répression dans l'intestin des gènes sensibles à la présence de la flore, dont les termes de Gene Ontology sont principalement relatifs à des processus développementaux. Ce gène est connu pour être impliqué dans la signalisation médiée par le morphogène decapentaplegic [185], qui est nécessaire pour assurer le développement des disques imaginaux chez la larve, et par conséquent la formation des structures particulières de l'adulte. La proposition de son rôle vis-à-vis de ma liste de gène est donc cohérente avec le fait qu'il régule l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans le développement.

Pour confirmer l'implication de ces facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de mes listes de gènes, il faut mesurer le niveau d'expression de ces gènes chez des individus pour lesquels l'expression de ces facteurs de transcription est affectée. Mais il est nécessaire de confirmer en premier lieu les données issues de l'analyse transcriptomique. Dans la section suivante, je présente les résultats obtenus par une méthode indépendante dans le but de confirmer les données présentées ici.

Tissu		
Intestins		Mouches
Flore	↓Processus développementaux <i>Mad</i>	↑Métabolisme (Protéolyse, Métabolisme des carbohydrates) <i>GATAe</i>
Génotype	↑Immunité <i>Relish</i>	-

TABLE 4.8 – Récapitulatif des données issues de l'analyse globale des listes de gènes dérégulés. Les facteurs de transcription putatifs identifiés par l'analyse bioinformatique à l'aide du logiciel CisTargetX sont indiqués en italique. Les détails des données issues de l'analyse par le logiciel sont présentés dans les figures 6.7 à 6.9, pages 207 à 209.

4.6.3.3 Validation des données obtenues

Validation des données sur un nouveau jeu d'échantillon

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN, j'ai collecté une nouvelle série d'échantillons, et j'ai quantifié par des réactions de polymérisation en chaîne quantitative l'expression des gènes les plus dérégulés. La table 4.9, page 105 indique pour chaque liste les 10% de gènes les plus dérégulés. L'expression de ces gènes a été vérifiée dans les nouveaux échantillons, et les résultats sont présentés dans 8 tables, 1 pour chaque liste (tables 4.10, page 106 à 4.16, page 111).

La majorité des gènes pour lesquels l'analyse transcriptomique sur puce à ADN indique que l'expression est induite par l'un ou l'autre des facteurs considérés montre effectivement une induction dans mon étude de validation. Par contre, la majorité de ceux dont l'analyse transcriptomique signale une répression n'est pas réprimée dans mon jeu d'échantillons de confirmation. En considérant l'ensemble des résultats, environ 25.7% des gènes initialement considérés comme induits ne le sont pas (9 gènes sur 35) et 75% des gènes réprimés ne le sont pas (15 gènes sur 20). Je rappelle que lors de l'analyse des résultats bruts issus de l'analyse transcriptomique, le taux de faux positifs avait été fixé à 20% (voir section 2.12, page 29). C'est à peu près ce qui est retrouvé dans le cas des gènes induits, mais ce n'est pas le cas des gènes réprimés.

Comparaison avec des données publiées

J'ai mentionné dans la partie concernant l'analyse de la physiologie intestinale les travaux de Buchon et al. [35] et Zinke et al. [255]. Les premiers ont étudié la réponse transcriptionnelle de la drosophile lors d'une infection par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora 15*, et les seconds ont étudié le profil d'expression du génome de la drosophile en réponse à la privation de nourriture et à une alimentation exclusivement composée de saccharose chez la larve. J'ai voulu savoir si les gènes qui sont dérégulés dans les conditions expérimentales que j'ai utilisées ici l'étaient également dans ces deux études. Je présente donc dans les tableaux mentionnés ci-dessus les résultats obtenus au cours de ces études pour les gènes qui sont communs à mes listes. La majorité des gènes induits dans l'intestin à cause de la mutation *pims^{Ey}* sont retrouvés dans les analyses de Buchon et al. (Table 4.13, page 109) ; mais seulement trois gènes sont retrouvés dans les données de Zinke et al. (Table 4.10, page 106).

Par ailleurs, Senger et al. [202] ont étudié l'impact de la surexpression de GATAe dans le corps gras chez la larve. Sur les 300 gènes induits, 15% sont des protéases ou des inhibiteurs de protéases, parmi lesquels je retrouve deux des gènes de la liste induite dans la mouche entière en présence de la flore (Table 4.10, page 106), ce qui renforce l'hypothèse que ce facteur de transcription soit impliqué dans la régulation de l'expression des gènes de cette liste.

Confirmation du rôle des facteurs de transcription putatifs identifiés par l'analyse CisTargetX

J'ai confirmé l'implication du facteur Relish dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes en utilisant des individus portant des mutations perte de fonction pour les gènes *pims* et *relish* (Table 4.13, page 109). Il n'est pas possible d'utiliser des mutants de perte de fonction des facteurs de transcription Mad ou GATAe car ils ne sont pas viables. Il est alors envisageable d'utiliser le système d'interférence à ARN pour diminuer l'expression de ces facteurs de façon contrôlée aux niveaux spatial et temporel. Cependant, étant donné le fait que les données concernant les gènes réprimés dans l'intestin par la présence de la flore ne sont pas validées, je ne cherche plus à identifier un facteur de transcription commun pour cette liste de gène, et par conséquent je ne cherche pas à tester le rôle putatif de Mad dans la régulation de ces gènes.

En ce qui concerne GATAe, j'ai utilisé plusieurs lignées d'interférence par ARN pour éteindre son expression de manière tissue spécifique dans l'intestin moyen, avec le système UAS / GAL4 et le pilote NP1-GAL4 [161]. Malheureusement, aucune de ces lignées n'a été efficace pour éteindre l'expression du gène, et je n'ai pas pu tester son implication dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de ces gènes à l'heure actuelle. En guise d'alternative, nous avons sollicité le Pr. Ryutaro Murakami²⁰ afin qu'il nous fasse parvenir la lignée UAS-GATAe qu'il a construite

20. Department of Biology and Chemistry, Faculty of Science, Yamaguchi University, Japan

[174], afin de tester l'impact d'une surexpression dans l'intestin d'individus axéniques de ce facteur de transcription sur le niveau d'expression des gènes induits dans la mouche entière par la présence de la flore.

4.6.4 Conclusion

Le travail présenté ici avait pour objectif d'identifier les processus biologiques de la drosophile qui sont influencés par la présence de la flore ou par l'activité de son système immunitaire. La démarche expérimentale repose sur la variation binaire de l'état de deux facteurs : le génotype de l'hôte au niveau d'un régulateur négatif de la voie de signalisation IMD, et la présence de bactéries dans l'environnement. Elle a été utilisée pour étudier la variation de l'expression des gènes à la fois localement (dans l'intestin) et de façon systémique (dans l'organisme entier). Sur les 8 listes de gènes établies, trois ont retenu une attention particulière car elles sont enrichies en gènes associés à des termes particuliers de type Processus Biologique de Gene Ontology : la liste des gènes induits dans la mouche entière par la présence de la flore, ceux qui sont réprimés dans l'intestin par ce même facteur, et ceux qui sont induits dans l'intestin par la mutation *pims^{Ey}*.

Une analyse bioinformatique supplémentaire a permis d'identifier les facteurs de transcription putatifs associés à ces listes de gènes : qui sont respectivement Relish, Mad et GATAe. Relish est déjà bien connu pour son rôle dans la régulation des gènes de l'immunité sous contrôle de la voie de signalisation IMD, et constitue une preuve de principe que la méthode mise en place pour identifier ces facteurs est efficace. La validation des données obtenues par une méthode indépendante ne permet finalement pas de retenir la liste de gènes réprimés dans l'intestin en présence de la flore, mais les deux autres listes sont conservées. Le rôle de Relish dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes induits dans l'intestin par la mutation *pims^{Ey}* est confirmé, et le travail nécessaire pour valider le rôle de GATAe, qui est un bon candidat pour expliquer la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme, est en cours.

Il est devenu évident aujourd'hui qu'une dérégulation de la voie de signalisation IMD par la mutation *pims^{Ey}* n'est pas aussi dramatique que celle provoquée par la perte simultanée de plusieurs régulateurs négatifs de cette voie [177]. Par conséquent, il est possible d'imaginer qu'une dérégulation plus forte de cette voie de signalisation débouche sur une modification du transcriptome de la drosophile qui dépasse le seul cadre de l'immunité. Il serait intéressant de mesurer, chez le double mutant *yw;pims^{Ey}/CyO;PGRP-LBΔ*, l'activité transcriptionnelle de certains gènes impliqués dans le métabolisme des protéines ou des sucres identifiés ici, afin de voir si une modification de l'expression de ces gènes due au génotype de l'hôte peut être corrélée au fait qu'ils se nourrissent moins (voir la section 4.5). Néanmoins ce travail a apporté un éclairage particulier sur les interactions entre la drosophile et sa flore commensale, et met clairement à jour le fait que la flore bactérienne influence le métabolisme de son hôte. Ces données font écho aux résultats publiés chez les mammifères qui montrent que la composition de la flore intestinale de la souris conditionne la capacité de cet animal à extraire l'énergie contenue dans son alimentation, et influence par conséquent sa santé [230].

Facteur	Tissu	Régulation	Gène	Taux	GO - Processus Biologique	GO - Fonction Moléculaire	GO - Composant Cellulaire
Flore	Mouches	Induits	Jon66Ci	4.7	Protéolyse	Endopeptidase à Serine	Inconnu
			PGRP-SC1a/b	3.9	Immunité	Amidase	Sécrété
			CG12057	3.5	Inconnu	Inconnu	Inconnu
			CG18180	3.3	Protéolyse	Endopeptidase à Serine	Inconnu
			CG9463	3.0	Transport de calcium	Alpha mannosidase	Lysosome
		Réprimés	GstD5	-2.2	Inconnu	Glutathione transferase	Inconnu
			CG11912	-2.2	Protéolyse	Endopeptidase à Serine	Inconnu
			Amyrel	3.5	Metabolisme des sucres	Alpha amylase	Inconnu
			mwh	2.6	Métabolisme de la chitine	Fixation à l'actine et aux RhoGTPases	Inconnu
			CG14744	2.5	Transport transmembranaire	Inconnu	Membranaire
	Intestins	Induits	CG42335	2.3	Régulation de la protéolyse	Amino-peptidase & Metalopeptidase	Inconnu
			Jon66Ci	2.2	Protéolyse	Endopeptidase à Serine	Inconnu
			Pka-R1	-2.0	Transduction de signal	Régulateur de kinase cAMP dépendante	Cytoplasme
			CG17159	-2.1	Inconnu	Inconnu	Inconnu
			pAbp	-2.2	Processus développementaux	Fixation aux régions 3'UTR des ARNm	Complexe Ribonucleoproteique
		Réprimés	CG17510	-2.3	Organisation de la mitochondrie	Inconnu	Inconnu
			Trc8	-2.3	Régulateur négatif de la croissance	Inconnu	Réticulum Endoplasmique
			CG9940	-2.7	Processus biosynthétiques	Fixation à l'ATP & Synthèse de NAD+	Inconnu
			GM07660 (Rbp2)	-3.0	Initiation de la traduction	Fixation à l'ARN	Cytoplasme
			Hf	-2.0	Immunité	Inconnu	Inconnu
	Mouches	Induits	Cht9	2.1	Métabolisme de la chitine	Chitinase	Espace extracellulaire
			CG4302	2.2	Métabolisme des Lipides	Glucuronosyltransferase	Inconnu
			Cyp12d1-d	2.5	Oxidation-reduction	Porteur d'électron	Mitochondrie
			GM130	3.5	Organisation du Golgi	Inconnu	Golgi & Réticulum Endoplasmique
			CG15661	4.0	Métabolisme des Lipides	Glucuronosyltransferase	Inconnu
		Réprimés	TKR	-2.0	Gravitaxie	Fixation à l'ADN	Inconnu
			CG10096	-2.0	Processus Métabolique	Activité catalytique	Inconnu
			CG6295	-2.1	Métabolisme des Lipides	Triglyceride lipase ; Phospholipase A1	Inconnu
			CG15067	-2.2	Neurogenèse	Inconnu	Inconnu
			CG4302	13.2	Métabolisme des Lipides	Glucuronosyltransferase	Inconnu
Génotype	Intestins	Induits	CG15661	7.2	Métabolisme des Lipides	Glucuronosyltransferase	Inconnu
			CG7443	6.4	Inconnu	Inconnu	Inconnu
			Edin	4.4	Immunité	Inconnu	Espace extracellulaire
			TotM	3.7	Réponse au Stress	Inconnu	Inconnu
			CG13905	3.3	Inconnu	Inconnu	Inconnu
		Réprimés	CG31686	3.1	Protéolyse	Inconnu	Inconnu
			CG11170	-1.9	Inconnu	Fixation à l'ATP & ATPase	Inconnu
			ana	-2.1	Croissance	Facteur de croissance	Espace extracellulaire
			CG9945	-2.1	Protéolyse	Inconnu	Complexe associé aux microtubules
			CG10505	-2.2	Réponse au Zinc et au Cuivre	Transporteur ATP dépendant	Transmembranaire
	Mouches	Induits	CG6034	-2.4	Oxidation-reduction	Oxidoreductase	Inconnu
			ninaD	-2.5	Processus développementaux	Récepteur de type éboueur	Membranaire
			CG17024	-2.6	biosynthèse des purines	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	Inconnu
			CG42365	-3.8	Protéolyse	Inconnu	Inconnu

TABLE 4.9 – Les 10% de gènes les plus dérégulés par la présence de la flore ou par la mutation *pims^{Ey}*. La colonne "Taux" indique le taux de variation de l'expression mesuré sur les puces à ADN. Les colonnes "GO - Processus Biologique", "GO - Fonction Moléculaire" et "GO - Composant Cellulaire" indiquent pour le gène considéré si un facteur de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire de Gene Ontology lui est associé, et lequel le cas échéant. Dans le cas de plusieurs terme, un seul est présenté. Les couleurs indiquent des gènes impliqués dans les mêmes processus biologiques : Métabolisme (Bleu) ou Immunité (Vert).

Gène	Puce	Q-PCR	Val	GO BP	GO MF	GO CC	GATAe	Senger	Zinke
<i>Jon66cii</i>	5.98	8.8	Oui	Protéolyse	Endopeptidase	ND	-	-	↓Restriction alimentaire
<i>PGRP-SC1</i>	5.20	16	Oui	Immunité	Amidase	Sécrété	674(2)	-	-
<i>Jon66ci</i>	4.63	13.6	Oui	Protéolyse	Endopeptidase	ND	-	-	nd
<i>CG18180</i>	3.77	3.6	Oui	Protéolyse	Endopeptidase	ND	-	↑79	nd
<i>CG12057</i>	3.54	0.6	Non	ND	ND	ND	-	-	↑Sucre
<i>CG12374</i>	3.05	1.6	Non	Protéolyse	Metallo-carboxypeptidase	ND	644(1)	↑35	no
<i>CG9643</i>	3.05	6.8	Oui	Transport du Calcium	α-mannosidase	Lysosome	730(3)	-	↓Sucre

TABLE 4.10 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la flore dans la mouche entière.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué). La colonne "GATAe" indique si un motif putatif de fixation du facteur de transcription GATAe a été localisé dans les séquences régulatrices du gène considéré, le nombre de motifs (entre parenthèses), et la position du gène dans les 1000 résultats de l'analyse (position moyenne si il y a plusieurs motifs). Les colonnes "Senger" et "Buchon" indiquent si des données existent pour le gène considéré dans les résultats d'analyses des travaux effectués par Senger et al. [202] et Buchon et al. [35].

Gène	Puce	Q-PCR	Val	GO BP	GO MF	GO CC	Senger
<i>CG31091</i>	7.03	1.92	Oui	Métabolisme Lipidique	Triglyceride lipase	ND	-
<i>Defensine</i>	5.40	3.64	Oui	Immunité	Peptide anti-microbien	Sécrété	-
<i>CG31089</i>	4.87	0.71	Non	ND	Triglycéride lipase	ND	-
<i>AttD</i>	3.65	5.89	Oui	Immunité	Peptide anti-microbien	Sécrété	-
<i>Amyrel</i>	3.55	1.14	Non	Metabolisme Carbohydrates	Glucosidase	ND	-
<i>CG10476</i>	3.12	3.39	Oui	ND	ND	ND	↑13.3
<i>Jon66cii</i>	3.21	8.71	Oui	Protéolyse	Endopeptidase	ND	-
<i>muh</i>	2.94	X	ND	Metabolisme de la chitine	ND	ND	-
<i>pims</i>	3.45	5.89	Oui	Immunité	ND	Cytoplasme	-
<i>CG14744</i>	2.48	0.9	Non	Transport membranaire	ND	Transmembranaire	-

TABLE 4.11 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la flore dans l'intestin.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. Un "X" signifie que la mesure n'a pas pu être effectuée en Q-PCR à cause de difficultés à produire un couple d'amorces efficace. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. "ND" indique que la validation n'a pas pu être testée. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué). La colonne "Senger" indique si des données existent pour le gène considéré dans les résultats d'analyses des travaux effectués par Senger et al. [202]. Aucun de ces gènes ne possède un motif reconnu par GATAe dans ses séquences régulatrices. Il n'y a aucune information pour ces gènes dans les données de Zinke et al. [255].

Gène	Puce	Q-PCR	Val	GO BP	GO MF	GO CC
<i>CG9940</i>	0.36	0.9	Non	Transport mem-branaire	Hydrolase	ND
<i>cp15</i> ²¹	0.08	1.4	Non	Catabolisme de la Chitine	Composant du chorion	Chorion
<i>eip75B</i> ²²	0.55	1.3	Non	Regulation de la Transcription	Facteur de Transcription	Noyau
<i>eip93F</i> ²³	0.59	1.6	Non	Autophagie & Mort cellulaire	Facteur de Transcription	Noyau
<i>foxo</i>	0.61	0.6	Oui	Regulation de la Transcription (Voie de signalisation de l'Insuline)	Facteur de Transcription	Noyau
<i>pten</i>	0.62	1.3	Non	Voie de signalisation de l'Insuline	Phosphatase activity	Cytoplasme
<i>hppy</i>	0.64	1.3	Non	Apoptose par voie JNK	kinase	ND
<i>akt1</i>	0.64	1.2	Non	Voie de signalisation de l'Insuline	kinase	Cytoplasme
<i>s6k</i>	0.66	1	Non	Voie de signalisation de l'Insuline	kinase	Cytoplasme
<i>InR</i> ²⁴	0.67	2.3	Non	Voie de signalisation de l'Insuline	Recepteur transmembranaire	Transmembranaire

TABLE 4.12 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes réprimés en présence de la flore dans l'intestin.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué). Les colonnes "Senger" et "Buchon" indiquent si des données existent pour le gène considéré dans les résultats d'analyses des travaux effectués par Senger et al. [202] et Buchon et al. [35].

GGène	Puce	Q-PCR	Val	Rel	GO BP	GO MF	GO CC	Buchon
<i>diptericine B</i>	30.39	112.3	Oui	Oui	Immunité	Peptide anti-microbien	Sécrété	↑Relish-dep en infection
<i>attacine D</i>	18.72	4.9	Oui	Oui	Immunité	Peptide anti-microbien	Sécrété	↑Relish-dep en infection
<i>CG4302</i>	13.92	6.6	Oui	Oui	Metabolisme des lipides	glucuronosyl-transférase	ND	↓Relish-dep en infection
<i>cp15</i>	8.77	0.8	Non	Oui	Catabolisme de la Chitine	Composant du chorion	Chorion	-
<i>CG15661</i>	7.32	13.7	Oui	Oui	Métabolisme	glucuronosyl-transférase	ND	
<i>defensine</i>	7.23	6.2	Oui	Oui	Immunité	Peptide anti-microbien	Sécrété	↑Relish-dep en infection
<i>PGRP-SD</i>	6.73	2.6	Oui	Oui	Immunité	Recepteur Peptidoglycane	Sécrété	↑Relish-dep en infection
<i>edin</i>	5.14	2.17	Oui	Oui	Immunité	ND	Sécrété	↑Relish-dep en infection
<i>cyp6a17</i>	4.59	X	ND	ND	oxydation-réduction	Transporteur d'électron	Membranaire	Rel & Inf Indep
<i>CG30263</i>	3.66	76.1	Oui	Oui	ND	ND	ND	ND
<i>CG5550</i>	3.65	1.9	Oui	Oui	Protéolyse	Fixation à récepteur	Matrice Extracellulaire	↑Relish-dep en infection
<i>CG4267</i>	3.41	2.1	Oui	Oui	Métabolisme lipidique	phospholipase	ND	↑Relish-dep en infection
<i>CG13905</i>	3.32	0.7	Non	Oui	ND	ND	ND	Inf, Rel, Starv -dep
<i>CG31686</i>	3.21	1.0	Non	Oui	ND	ND	ND	↑Relish-dep en infection

TABLE 4.13 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la mutation *pims^{Ey}* dans l'intestin.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. Un "X" signifie que la mesure n'a pas pu être effectuée en Q-PCR à cause de difficultés à produire un couple d'amorces efficace. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. "ND" indique que la validation n'a pas pu être testée. La colonne "Rel" indique si le rôle du facteur de transcription Relish concernant la régulation du gène considéré est validé chez les double mutant *yw;pims^{Ey};relish*. "ND" indique que la validation n'a pas pu être testée. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué). La colonne "Buchon" indique si des données existent pour le gène considéré dans les résultats d'analyses des travaux effectués par Buchon et al. [35]. Aucune données n'est présentes concernant ces gènes dans les travaux de Senger et al. [202].

Gène	Puce	Q-PCR	Val	GO BP	GO MF	GO CC
<i>CG42365</i>	0.25	0.004	Oui	Protéolyse	ND	ND
<i>ninaD</i>	0.40	0.43	Oui	Phototransduction	Récepteur Eboueur	Membrane
<i>CG17024</i>	0.33	1.18	Non	Synthèse Purine	Carboxylase	ND
<i>CG6034</i>	0.41	1.16	Non	ND	ND	ND
<i>CG10505</i>	0.43	X	ND	Transport trans- membranaire	Transporteur	Transmembranaire
<i>CG9945</i>	0.44	1.24	Non	Protéolyse	ND	Cytoplasme
<i>ana</i>	0.48	1.44	Non	Croissance	Facteur de Crois- sance	Extracellulaire
<i>CG11170</i>	0.47	X	ND	ND	ND	ND

TABLE 4.14 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes réprimés en présence de la mutation *pims^{Ey}* dans l'intestin.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. Un "X" signifie que la mesure n'a pas pu être effectuée en Q-PCR à cause de difficultés à produire un couple d'amorces efficace. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. "ND" indique que la validation n'a pas pu être testée. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Puce	Q-PCR	Val	GO BP	GO MF	GO CC
<i>attacine D</i>	8.26	7.5	Oui	Immunité	Peptide antimicro- bien	Sécrété
<i>CG15661</i>	7.32	13.7	Oui	Métabolisme	glucuronosyl- transférase	ND
<i>GM130</i>	3.66	1.8	Oui	organisation Golgi	ND	Golgi
<i>cyp6a17</i>	3.04	X	ND	oxydation- réduction	Transporteur d'électron	Membranaire
<i>CG5550</i>	2.68	1.2	Non	Protéolyse	Fixation à récep- teur	Matrice Extracel- lulaire
<i>CG4302</i>	2.60	2.6	Oui	Metabolisme des lipides	glucuronosyl- transférase	ND
<i>edin</i> ²⁵	1.72	4.6	Oui	Immunité	ND	Sécrété

TABLE 4.15 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes induits en présence de la mutation *pims^{Ey}* dans la mouche entière.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. Un "X" signifie que la mesure n'a pas pu être effectuée en Q-PCR à cause de difficultés à produire un couple d'amorces efficace. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. "ND" indique que la validation n'a pas pu être testée. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Puce	Q-PCR	Val	GO BP	GO MF	GO CC
<i>pims</i>	0.19	0.1	Oui	Immunité	ND	Cytoplasme
<i>CG12374</i>	0.40	1.18	Non	Protéolyse	Metallo-carboxy-peptidase	ND
<i>CG31463</i>	0.42	0.52	Oui	ND	ND	ND
<i>CG15067</i>	0.45	1.03	Non	ND	ND	ND
<i>TKR</i>	0.47	0.65	-	gravitaxie	Fixation ADN	ND

TABLE 4.16 – Validation par Q-PCR de la liste de gènes réprimés en présence de la mutation *pims*^{Ey} dans la mouche entière.

La colonne "Gène" indique le nom du gène considéré. La colonne "Puce" indique le niveau d'expression relatif détecté dans cette condition par rapport à la condition contrôle (chez les sauvages). La colonne "Q-PCR" indique le taux d'expression du gène mesuré par Q-PCR dans un jeu d'échantillons indépendants. La colonne "Val" indique si j'ai considéré que les données issues de l'analyse transcriptomique sur puces à ADN ont été validées par les mesures effectuées en Q-PCR. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

4.7 Conclusion

Ce chapitre présente le travail que j'ai effectué dans le cadre de l'étude des relations de commensalisme chez la drosophile. En effet, nous avons vu au cours du chapitre précédent que la présence des microorganismes de l'environnement affecte la qualité de vie de cet insecte, aux stades larvaires comme chez l'adulte. J'ai caractérisé la flore bactérienne associée aux cultures de drosophiles que je cultive au laboratoire, à la fois qualitativement et quantitativement. La flore bactérienne interne des drosophiles que j'entretiens contient moins d'une dizaine d'espèces, parmi lesquelles 3 espèces majeures et 3 espèces mineures ont été identifiées : *Aerococcus viridans*, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecalis* d'une part, *Corynebacterium nuruki*, *Pectobacterium carotovorum* et *Ochrobactrum pseudogrignonense* d'autre part. Les individus portant une mutation qui affecte l'activité de leur système immunitaire possèdent une flore identique à celle des individus sauvages, autant que le niveau de résolution de mon étude permette d'en juger. Les charges bactériennes des drosophiles élevées de façon conventionnelle sont apparues très variables, et ce constat m'a poussé à mettre au point une nouvelle méthode de travail dans le but de garantir une charge bactérienne interne relativement élevée et homogène parmi les différents individus d'une population. Il s'agit de préincuber les drosophiles qui vont servir à une expérimentation dans un environnement qui contient une communauté microbienne standardisée, en apportant dans le milieu un cocktail de bactéries composé d'une quantité précise de 4 espèces commensales connues : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter pomorum* et *Commensalibacter intestini*. Ce nouveau mode de fonctionnement m'a permis d'étudier l'impact de la flore bactérienne sur l'homéostasie de l'épithélium intestinal, sur la physiologie de cet organe, et sur l'activité transcriptionnelle du génome dans l'intestin et dans l'organisme entier.

J'ai commencé la caractérisation de l'activité des cellules souches intestinales en réponse à la colonisation du tube digestif par la bactérie *Lactobacillus plantarum*, ainsi qu'en réponse à une infection par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15 et à l'ingestion d'une molécule toxique. Je voulais voir si la dérégulation de la voie de signalisation IMD due à la perte de fonction du gène *pims* avait une influence sur la réponse de l'épithélium à ces stress. Les travaux effectués en parallèle par l'équipe du Pr. Lemaitre et publiés dans la revue *Immunity* en 2011 [177] reproduisent la démarche que je m'étais proposée de suivre, et révèlent l'importance de maintenir cette voie de signalisation sous un retro contrôle négatif afin de garantir l'intégrité de l'épithélium intestinal et la viabilité de l'organisme. Il apparaît en outre dans la comparaison de nos données respectives que la régulation négative de la voie IMD, qui repose sur l'activité simultanée de plusieurs acteurs, est un système robuste.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Irene Miguel-Aliaga, j'ai étudié l'impact de la présence de bactéries et de l'activité du système immunitaire sur la physiologie intestinale de la drosophile, en étudiant ses déjections. Il semble que la dérégulation de la voie IMD chez le double mutant *yw;pims^{Ey}/CyO;PGRP-LBΔ* influence l'appétit de l'animal, en sorte qu'il consomme moins de nourriture. A ma connaissance, c'est la première fois qu'un tel constat est fait chez la drosophile, et ouvre des perspectives pour donner suite à ce travail. Il serait intéressant de caractériser plus en détails les activités métaboliques de l'organisme par des méthodes de biologie moléculaire et de biochimie.

Finalement, j'ai terminé l'étude des relations de commensalisme entre la drosophile et les bactéries en pratiquant une analyse transcriptomique du génome de l'hôte, en collaboration avec Pascal Rihet, Denis Puthier et Delphine Potier. L'analyse transcriptomique que j'ai effectuée avait deux objectifs : identifier les gènes dont l'expression est affectée par la présence d'une flore bactérienne d'une part, et ceux dont l'expression varie en fonction du niveau d'activité du système immunitaire d'autre part. L'intérêt de cette démarche, en complément du travail présenté dans les autres sections de ce chapitre consacré au commensalisme, est qu'elle est naïve et ne repose sur

aucune hypothèse de travail. Elle a permis de révéler un rôle de la présence de la flore intestinale sur les activités transcriptionnelles de gènes impliqués dans le métabolisme de l'organisme, en particulier celui des sucres et des protéines ; et de prendre conscience du fait que la voie de signalisation IMD n'influence pas de processus autre que l'immunité. Une analyse plus poussée de ces données a débouchée sur l'identification de trois facteurs de transcription potentiellement impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes dérégulés. L'un d'entre eux, Relish, est déjà bien connu et constitue une preuve de principe que la méthode mise en place pour identifier ces facteurs est efficace. La validation des données obtenues concernant un autre facteur, GATAe, est en cours et semble prometteuse.

Ces travaux constituent une première étape dans l'étude des relations de commensalisme entre la drosophile et les bactéries présentes dans son environnement. Le fait que la flore commensale des drosophiles que nous entretenons au laboratoire contient un petit nombre d'espèces, qui sont facile à cultiver par des méthodes de microbiologie classique, associé au fait qu'il est possible d'entretenir cet insecte dans un environnement axénique, m'a permis de manipuler la composition de cette communauté microbienne comme je le désirais. Ce potentiel a permis de commencer à étudier l'impact de la flore sur son hôte, et les résultats obtenus indiquent qu'elle influence en particulier le métabolisme des protéines et des sucres. Ces observations ont déclenché le lancement d'un autre projet au sein du laboratoire, dont le but est de caractériser l'impact des bactéries commensales au cours de la vie larvaire de la drosophile, une étape durant laquelle la forte croissance de l'organisme nécessite l'acquisition et l'assimilation de grande quantité de matière première et d'énergie à partir de l'alimentation. Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de la colonisation par *Lactobacillus plantarum* dans la promotion de la croissance systémique des larves élevées en condition de carence alimentaire. Elle a débouché sur la publication d'un article dont je suis principal co-signataire dans la revue *Cell Metabolism* en 2011 [216], et une copie de cet article est incluse dans l'annexe 6.2, page 121.

Chapitre 5

Conclusions

Durant ma thèse, je me suis intéressé aux interactions qui se produisent entre les animaux et les microorganismes. J'ai utilisé la drosophile comme organisme animal modèle, dont le système immunitaire fait l'objet d'études intensives depuis plus d'une vingtaine d'années. Les données obtenues au cours de ces travaux complètent les connaissances sur l'immunité de la drosophile d'une part et permettent de commencer à entrevoir les aspects du commensalisme entre cet animal et les bactéries de son environnement d'autre part. Les méthodes et les résultats présentés ouvrent des perspectives multiples.

5.1 Les mécanismes de défense de la drosophile lors d'infections systémiques

Le système immunitaire de la drosophile repose exclusivement sur des mécanismes innés. Il a été très étudié et son fonctionnement était déjà bien décrit quand je commençais ma thèse. En particulier, il était clairement établi que la résistance aux infections bactériennes systémiques induites par une blessure septique dépend de l'activation des voies de signalisation de type NF- κ B Toll ou IMD dans le corps gras, permettant à la sécrétion massive par ce tissu de peptides antimicrobiens dans l'hémolymph. En parallèle à ce phénomène, des cellules circulantes avec un potentiel immunitaire sont présentes dans l'hémolymph, mais leur contribution dans la résistance à ce type d'infection n'avait pas été évaluée.

J'ai présenté ici une étude qui démontre que ces cellules sont requises pour assurer la résistance à certaines infections systémiques, en particulier *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*, mais pas toutes. Ce travail fait écho aux données publiées par Haine et al. [95] qui montraient chez l'insecte *Tenebrio molitor* que l'élimination de *Staphylococcus aureus* se fait principalement par des mécanismes de défenses indépendants de la synthèse des peptides antimicrobiens. En parallèle à d'autres auteurs [44, 207], j'ai montré chez la drosophile que les peptides antimicrobiens sont nécessaires mais insuffisants pour assurer la résistance à cette bactérie, et les hémocytes contribuent à la résistance de l'organisme par des mécanismes dépendant de l'expression du gène *eater*, un récepteur transmembranaire nécessaire à la phagocytose de *Staphylococcus aureus*, pointant vers le rôle de la phagocytose par les hémocytes dans la résistance à l'infection. Ces résultats complètent la connaissance que nous avons sur un aspect qui était resté jusqu'alors peu étudié du système immunitaire de la drosophile, à savoir la réponse cellulaire aux infections systémiques.

Par ailleurs, mes travaux révèlent l'apport des cellules circulantes dans le maintien de l'ho-

méostasie générale de l'organisme, en particulier dans la gestion des relations avec les microbes de l'environnement. En effet, les bactéries naturellement en contact avec nos stocks de drosophiles ont un impact sur leur développement larvaire et leur longévité au stade adulte, et les hémocytes sont apparus comme les gardiens de l'équilibre biologique de l'individu en réponse aux stress d'origine microbienne.

5.2 Manipulation de la flore commensale

J'ai commencé à étudier les relations de commensalisme chez la drosophile. J'ai débuté par une identification des espèces bactériennes qui, au sein de notre laboratoire, lui sont associées. Il en résulte qu'un petit nombre d'espèces compose la flore interne de l'organisme, ce qui est en accord avec les résultats publiés par d'autres équipes. La présence de *Lactobacillus plantarum* dans mes populations de drosophiles et dans tous les autres laboratoires qui ont mené ce type d'étude suggère une association particulièrement forte entre cette bactérie et cet insecte.

Les expériences de manipulation de la flore commensale chez la drosophile ont permis de mettre en évidence l'impact de ces microorganismes sur la physiologie et le métabolisme de l'animal. Le métabolisme des protéines semble particulièrement affecté par la présence d'une communauté microbienne dans l'environnement. Ces travaux ont ouvert des perspectives qui ont conduit à l'étude de l'influence de la flore commensale bactérienne durant les phases de croissance larvaires. Ce projet a révélé l'impact de la bactérie *Lactobacillus plantarum* dans cette période du cycle de vie de l'animal, qui augmente la capacité de croissance de son hôte lorsque l'environnement contient des ressources limitées en acide aminés.

De la même façon, la modulation du métabolisme de l'hôte par la flore intestinale a été observée chez les mammifères. Les travaux de Turnbaugh et al. [230] montrent que la flore intestinale d'individus humains obèses est de composition différente de celle d'individus sains, et que lorsqu'elle est transplantée chez des souris initialement axéniques, la flore intestinale prélevée à partir des individus humains obèses induit une prise de poids plus importante chez leur nouvel hôte que celle induite par la transplantation de la flore d'individus humains sains. La flore intestinale des animaux joue donc clairement un rôle dans le métabolisme de leur hôte en affectant leur capacité à extraire les nutriments à partir de leur alimentation.

L'industrie agroalimentaire avait déjà observé qu'il était utile de manipuler la flore intestinale des animaux d'élevage. En l'occurrence, il est bénéfique pour les animaux de posséder des lactobacilles [55], car la production d'acide lactique dérivé de leur métabolisme provoque une acidification de l'intestin, et permet ainsi d'éviter sa colonisation par des espèces potentiellement pathogènes. Cette industrie a donc organisé l'exploitation de certaines espèces bactériennes, dont *Lactobacillus plantarum*, comme agent probiotiques additionné à la nourriture donnée aux animaux [28]. Des probiotiques basés sur l'administration de lactobacilles sont aussi commercialisés pour les humains.

5.3 La théorie de l'évolution animale sous forme d'hobionte

En ce qui concerne la digestion des aliments, les animaux n'ont pas eu besoin d'évoluer de grandes quantités d'activités enzymatiques dans le but de dégrader les molécules complexes qui sont ingérées, car les microorganismes possèdent déjà un grand nombre d'activité de ce type. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la dégradation des sucres complexes présents dans les végétaux. En effet, si on considère de façon succincte les étapes fondamentales de l'apparition

de la vie sur Terre, on conviendra que les formes de vies unicellulaires sont apparues en premier, que les formes de vie multicellulaires végétales sont apparues ensuite, et que les formes de vies animales sont apparues en dernier. Les microorganismes ont donc été au contact des végétaux depuis toujours, et ont eu le temps de développer une multitude d'activités enzymatiques dédiées à la dégradation des sucres complexes qui les composent. Les animaux qui se nourrissent de végétaux, et qui hébergent dans leur appareil digestif une flore microbienne, peuvent se contenter de laisser le soin aux microorganismes de dégrader les sucres complexes dérivés des végétaux qu'ils ingèrent. Ainsi, nous trouvons dans nos flores intestinales des espèces bactériennes dont le génome encode des centaines d'enzymes digestives, bien plus que ce que notre génome encode [249]. De plus, la dynamique très rapide d'évolution génomique de ces formes de vies unicellulaires leur permet d'acquérir de nouvelles fonctions biologiques adaptées à leur environnement. Un exemple remarquable qui illustre ce point est la démonstration de l'acquisition par une bactérie résidente de la flore commensale humaine d'une activité enzymatique originaire d'une bactérie marine non résidente, avec la capacité de dégrader des fibres végétales marines, qui sont fondamentalement différentes des fibres végétales terrestres, et pour lesquelles les bactéries de la flore intestinale humaine n'ont généralement pas d'activité de dégradation adéquate [100].

Toutes ces données supportent la théorie de l'évolution des organismes multicellulaires sous forme d'holobiontes, où les pressions de sélection s'exercent non pas seulement sur l'animal, mais sur un ensemble composé de l'animal et de sa flore commensale. En effet, les formes de vies unicellulaires ont des temps de génération incomparablement plus courts que les animaux qu'ils cotoient, et leur génome subissent de ce fait des évolutions beaucoup plus rapides que le génome de leurs hôtes. Par ailleurs, leur capacité à capter des éléments génétiques à partir de l'environnement et à les échanger par des transferts horizontaux confère à leur génome une plasticité naturelle et une dynamique d'évolution d'autant plus rapide. Ce point de vue propose que les microorganismes présents au niveau des épithélia des animaux sont les premières unités de l'holobionte qui évoluent en réponse aux variations de l'environnement. Il ne suffit donc pas de considérer le génome de l'animal pour étudier son potentiel biologique, mais encore ceux des microorganismes qui composent sa flore commensale : le "métagénome" de la flore intestinale.

5.4 La nécessité de caractériser la flore intestinale et étudier son impact fonctionnel sur l'hôte

Le génome humain a été séquencé en 2001 [128, 57], au terme de 13 années d'efforts internationaux. Rapidement, le besoin de séquencer le métagénome de la flore intestinale en complément du génome humain s'est fait ressentir, et deux initiatives de grande ampleur ont été lancées en 2008 pour atteindre cet objectif : le Human Microbiome Project¹ [229] a été financé par le *National Institute of Health* aux Etats-Unis d'Amérique, et le projet MetaHIT² a été conduit en Europe dans le cadre du *Seventh Framework Programme*³. Ces travaux arrivent à leur terme, et ont produit énormément d'informations. Ils mettent en avant le fait que si certaines espèces ne sont pas retrouvées chez tous les individus, il n'en demeure pas moins que certains gènes apportés par les microorganismes sont présents dans tous les métagénomes étudiés, indiquant que la structure de la flore commensale peut être déterminée par des pressions de sélection au niveau des activités biologiques qu'elle apporte. Cela souligne aussi l'intérêt des études de génomiques fonctionnelles de la flore. Ces deux projets vont sans aucun doute contribuer richement à notre compréhension de l'impact de la flore sur son hôte, mais des modèles plus simples, dans lesquels

1. Human Microbiome Project : <http://www.hmpdacc.org/>

2. Metagenomics of the Human Intestinal Tract : <http://www.metahit.eu/>

3. *Seventh Framework Programme* : http://cordis.europa.eu/fp7/home_en.html

des études de génomique fonctionnelle puissent être envisagées, apporteront nécessairement un éclairage supplémentaire sur la situation.

5.5 Le besoin d'un modèle simpliste

Il est devenu évident aujourd'hui que l'impact de la flore microbienne intestinale de la drosophile influence sensiblement de multiples paramètres physiologiques et comportementaux de l'animal, agissant directement sur sa capacité à s'adapter à l'environnement. Par exemple, en plus du rôle joué par *Lactobacillus plantarum* sur le métabolisme de son hôte et sa capacité de croissance durant les stades larvaires, il a été observé que cette bactérie affecte aussi le comportement sexuel de la drosophile. En effet, les individus qui possèdent cette espèce dans leur flore intestinale ont plus tendance à s'accoupler entre eux qu'avec les individus qui ne la possèdent pas [204, 205].

Toutes les informations présentées ici suggèrent que la drosophile peut constituer un bon modèle d'étude pour étudier les aspects fonctionnels des interactions qu'elle développe avec sa flore commensale. Puisque la drosophile abrite un nombre restreint d'espèces bactériennes, et qu'elles sont aisément cultivables par des méthodes classiques de microbiologie, il est possible de manipuler la composition de sa flore avec une résolution au niveau de l'espèce, afin d'étudier son impact fonctionnel sur l'animal. Dans un souci de simplicité, on peut aussi envisager d'étudier chaque espèce une par une, dans une situation de mono-association entre la drosophile et une espèce bactérienne partenaire particulière. Dans cette perspective, l'espèce *Lactobacillus plantarum* est le candidat de prédilection. Grâce aux technologies actuelles de séquençage à haut débit, et au potentiel de manipulation génétique de chaque partenaire, le couple *Drosophila melanogaster* - *Lactobacillus plantarum* est certainement un modèle de choix pour mener les études de génomiques fonctionnelles qui manquent encore actuellement pour augmenter notre compréhension des interactions de commensalisme entre un animal hôte et les microorganismes, et alimentera certainement les réflexions autour du concept de l'évolution des animaux sous forme d'holobionte.

5.6 Remarques conclusives sur les relations hôtes - microbes

Les interactions hôte - microorganismes dans le règne animal sont nombreuses et influentes. Elles affectent de nombreux paramètres physiologiques de l'hôte, ayant un impact sur sa capacité à s'adapter à l'environnement. Historiquement, les travaux menés dans le domaine de l'immunologie ont principalement servi à comprendre comment les organismes multicellulaires se défendent lorsqu'ils sont infectés par des formes de vies exogènes. La connaissance acquise nous a permis d'augmenter considérablement la qualité de vie qui est la nôtre aujourd'hui, ayant éradiqué plusieurs fléaux qui avaient autrefois décimé les populations, et sachant comment aider notre système immunitaire à combattre les microbes par des moyens pharmaceutiques. Cependant, un intérêt grandissant est en train de se développer pour la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux relations de commensalisme.

Il est clair aujourd'hui qu'en dehors des situations d'infection, les bactéries peuvent affecter la *fitness* de leurs hôtes. Elles lui apportent des activités biologiques qu'il ne possède pas, et qui peuvent augmenter sa capacité à extraire des nutriments à partir de son alimentation. En parallèle, le maintien sous contrôle de ces populations microbiennes a un coût pour l'organisme, comme le suggère l'augmentation de la longévité des drosophiles élevées en contexte axénique. Dans ses activités de contrôle, le système immunitaire doit être proprement régulé afin de ne

pas déclencher des réactions qui perturberaient inutilement l'équilibre biologique de l'organisme et qui seraient délétaire, réduisant finalement sa *fitness*. C'est ce qui a été observé dans des doubles ou triples mutants de la voie IMD chez la drosophile, et chez les patients souffrant des maladies d'inflammation chronique de l'intestin chez l'homme. L'étude du commensalisme chez la drosophile, en particulier dans ses relations avec la bactérie *Lactobacillus plantarum*, apportera certainement son lot de découvertes qui permettront de mieux comprendre les mécanismes génétiques et moléculaires qui déterminent la qualité de leur relation.

Chapitre 6

Annexes

6.1 Carte du vecteur PGEM-T Easy

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points :

T7 RNA polymerase transcription initiation site 1
 multiple cloning region 10–128
 SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3) 139–158
 SP6 RNA polymerase transcription initiation site 141
 pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site 176–197
 lacZ start codon 180
 lac operator 200–216
 β-lactamase coding region 1337–2197
 phage f1 region 2380–2835
 lac operon sequences 2836–2996, 166–395
 pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site 2949–2972
 T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3) 2999–3

Note : Inserts can be sequenced using the SP6 Promoter Primer (Cat.# Q5011), T7 Promoter Primer (Cat.# Q5021), pUC/M13 Forward Primer (Cat.# Q5601), or pUC/M13 Reverse Primer (Cat.# Q5421).

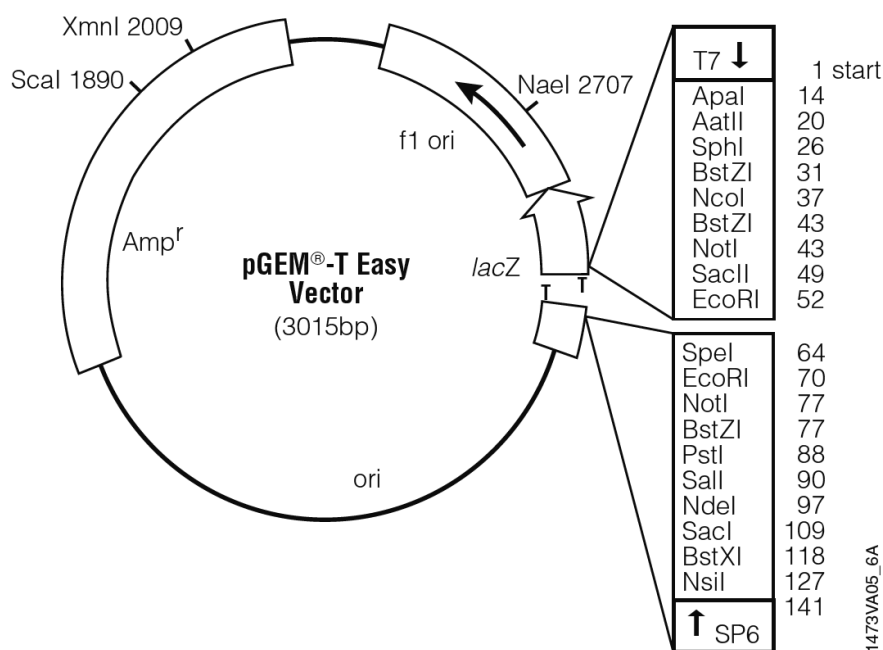


FIGURE 6.1 – Carte du vecteur PGEM-T Easy de *Promega*.

6.2 Article 2

Lactobacillus plantarum Promotes *Drosophila* Systemic Growth by Modulating Hormonal Signals through TOR-Dependent Nutrient Sensing

Gilles Storelli,^{1,3} Arnaud Defaye,^{1,3} Berra Erkosar,¹ Pascal Hols,² Julien Royet,^{1,*} and François Leulier^{1,*}

¹Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy (IBDML), CNRS UMR 6216/Aix-Marseille Universités, 13288 Marseille, France

²Institut des Sciences de la Vie (ISV), Université Catholique de Louvain, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

³These authors contributed equally to this work

*Correspondence: julien.royet@ibdml.univmed.fr (J.R.), francois.leulier@ibdml.univmed.fr (F.L.)

DOI 10.1016/j.cmet.2011.07.012

SUMMARY

There is growing evidence that intestinal bacteria are important beneficial partners of their metazoan hosts. Recent observations suggest a strong link between commensal bacteria, host energy metabolism, and metabolic diseases such as diabetes and obesity. As a consequence, the gut microbiota is now considered a “host” factor that influences energy uptake. However, the impact of intestinal bacteria on other systemic physiological parameters still remains unclear. Here, we demonstrate that *Drosophila* microbiota promotes larval growth upon nutrient scarcity. We reveal that *Lactobacillus plantarum*, a commensal bacterium of the *Drosophila* intestine, is sufficient on its own to recapitulate the natural microbiota growth-promoting effect. *L. plantarum* exerts its benefit by acting genetically upstream of the TOR-dependent host nutrient sensing system controlling hormonal growth signaling. Our results indicate that the intestinal microbiota should also be envisaged as a factor that influences the systemic growth of its host.

INTRODUCTION

For historical reasons and biomedical concerns, bacteria have been mainly studied for their harmful effects on human health. However, growing evidence suggests that bacteria are also important beneficial partners of metazoans (Fraune and Bosch, 2010). Interactions between bacteria and their animal hosts can be viewed in terms of a continuum ranging from symbiosis or commensalism to pathogenicity (Hooper and Gordon, 2001). The term commensalism comes from the Medieval Latin “commensalis,” meaning “eating at the same table,” and refers to a host-microbial interaction that does not result in perceptible host damage (Casadevall and Pirofski, 2000). As opposed to saprophytes that live independently of an animal host, commensal bacteria colonize their host generally at birth, through vertical transfer, and are acquired constantly during the host life from the environment through ingestion. Therefore, numerous

commensal bacteria reside in the host intestine, a nutrient-rich environment, where they form a vast, complex, and dynamic consortium of indigenous microbial species collectively referred as the microbiota (Hooper and Gordon, 2001).

Although it has been known for decades that humans carry ten times more bacterial cells than their own cells (Savage, 1977), the human microbiota characterization has previously been hampered by the difficulty of cultivating most gut bacterial species in laboratory conditions. Thanks to the revolution of deep-sequencing technologies, the commensal metagenome now starts to be unraveled (Furrie, 2006). Recent studies suggest that it contains about 150 times more genes than the human gene complement and shows a significant enrichment in genes encoding metabolic activities (Gill et al., 2006; Nelson et al., 2010; Qin et al., 2010). Hence, the idea that the intestinal microbiota constitutes an additional organ has recently re-emerged (Bocci, 1992; O'Hara and Shanahan, 2006). Intestinal bacteria communities shape the nutrient environment of the host by contributing enzymatic activities that break down otherwise non-digestible carbohydrates (Hooper et al., 2002). They also salvage energy through carbohydrate fermentation, leading to the production of short-chain fatty acids (Venema, 2010). In this light, the gut microbiota is now deemed a “host” factor that influences energy uptake (Bäckhed et al., 2005). The link between commensal bacterial communities and energy metabolism is further supported by recent evidence suggesting a strong association between the composition of the intestinal microbiota and metabolic diseases such as diabetes and obesity (Burcelin et al., 2009; Cani and Delzenne, 2009). However, the molecular mechanisms through which microbiota exerts its beneficial or detrimental influences remain largely undefined (Sekirot et al., 2010). Important unsolved basic questions are still standing in the field. For instance, do specific bacterial strains account for the benefit or the damage caused by the microbiota, and if so, which ones? In addition, besides optimizing energy harvest, do commensal bacterial species influence other systemic physiological parameters? Bacterial complement referred as “probiotics” have now been used for decades in the farming industry to promote growth of poultry, calves, and pigs; however, the precise mechanisms underlying these enhancements are still highly debated (Delzenne and Reid, 2009; Ehrlich, 2009; Raoult, 2009; Simon, 2005). These debates highlight the need of using experimental models to evaluate the role of intestinal bacteria as animal growth promoters.

To tackle these biological questions, we used *Drosophila melanogaster* as a host model. Indeed, over the last 4 years *Drosophila* has emerged as a powerful animal model to study host-commensal biology. Wild or lab-raised *Drosophila* carry simple bacterial communities composed of a maximum of 20 species with usually 3–4 dominant Lactobacillales and Acetobacteraceae species (Corby-Harris et al., 2007; Cox and Gilmore, 2007; Ren et al., 2007; Ryu et al., 2008). Recent reports, including our work, have begun to illustrate the molecular dialog between the microbiota and the intestinal epithelium. The *Drosophila* microbiota promotes immunomodulation by triggering the expression of negative regulators of innate immune signaling in intestinal epithelial cells (Lhocine et al., 2008; Ryu et al., 2008) and influences epithelial homeostasis through the promotion of intestinal stem cell activity (Buchon et al., 2009). A previous report suggested that the indigenous bacteria promote *Drosophila* lifespan (Brummel et al., 2004), supporting the idea that the *Drosophila* microbiota contributes somehow to its host biology; however, this observation is now seriously questioned (Ren et al., 2007). Although it has recently been shown that *Drosophila* commensal bacteria influence their host mating preference and are likely to severely impact *Drosophila* ecology in its natural environment (Sharon et al., 2010), the contribution of the microbiota to its host physiology is currently unknown. In this study, we demonstrate that the *Drosophila* gut microbiota promotes larval growth upon nutrient scarcity. We further identify the bacterial species present in the gut of our laboratory fly strain and show that one of them, *Lactobacillus plantarum*, recapitulates the microbiota growth-promoting effect. Finally, we show that *L. plantarum* exerts its beneficial effect on larval growth through the host nutrient sensing system, which relies on tissue-specific TOR activity controlling systemic hormonal growth signaling.

RESULTS

Drosophila Microbiota Sustains Optimal Larval Development upon Nutrient Scarcity

The growth phase of insects is restricted to the larval stages, where size gain can be spectacular in certain species. In *Drosophila melanogaster*, individuals increase their size by about 200-fold during the three larval instars (Robertson, 1963). This massive larval growth is fully dependent on food richness, since culture on poor-nutrient medium severely impacts *Drosophila* systemic growth and results in a marked delay of adult emergence (Layalle et al., 2008; Robertson, 1963). In order to test the putative contribution of *Drosophila* microbiota to its host systemic growth, we compared the timing of adult emergence of germ-free (GF) and conventionally reared (CR) siblings. Although no significant difference was observed between GF and CR larvae raised on rich medium (Figures 1A and 1B), spectacular growth delays were noticed when larvae were reared on poor-nutrient conditions. Consistent with previous reports, reduction of the amount of yeast extract in the medium results in about 2.5 days delay of adult emergence for CR individuals (Figures 1A and 1B) (Layalle et al., 2008). Strikingly, this delay was more than doubled for individuals raised in GF conditions, since GF adults emerged 2.9 days later than their CR siblings (Figures 1A and 1B; Table S1). These data demonstrate that

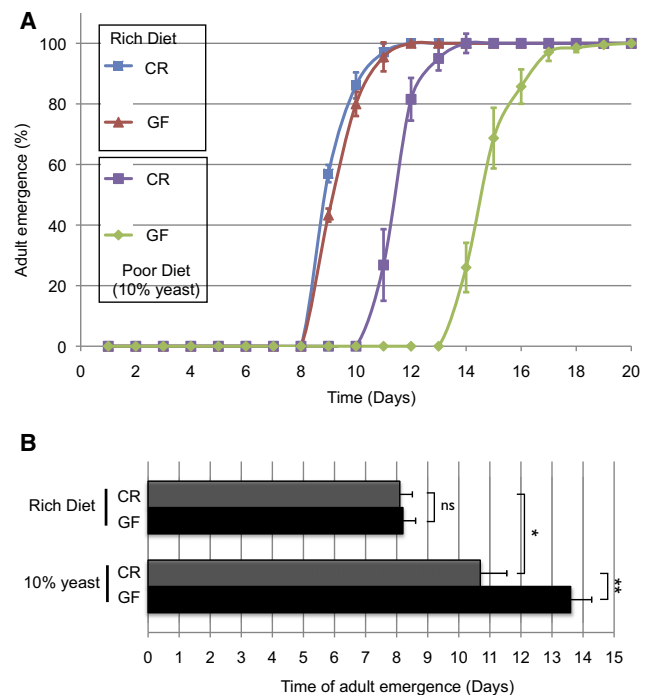


Figure 1. *Drosophila* Microbiota Sustains Optimal Larval Development upon Nutrient Scarcity

(A) Developmental timing of germ-free (GF) or conventionally reared (CR) individuals grown on either rich or poor diet (10% yeast). The cumulative percentage of the adult population emergence is shown over time. Data represent the mean of n biological replicates containing at least 30 individuals each $\pm$ SEM ($n = 8$ for CRyw/poor diet, purple square; $n = 7$ for GFyw/poor diet, green diamond; $n = 6$ for CRyw/rich diet, blue square; $n = 6$ for GFyw/rich diet, red triangle).

(B) Mean time of the emergence of 10% of the whole germ-free (black) or conventional (gray) adult population grown on either rich or poor diet (10% yeast). Statistical significance of the results is included (Student's t test, ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

although the *Drosophila* microbiota is dispensable for larval growth, it is necessary for optimal larval development upon nutrient scarcity.

Lactobacillus plantarum Colonizes *Drosophila* Midgut

In order to identify which commensal bacterial species mediate this effect, we characterized the bacterial communities associated with our CR fly strain. To this end, we generated bacterial 16S rRNA gene libraries from whole flies and dissected midguts. Analyses of clone sequences indicate that each library contains 16S clones of three bacterial phylotypes, one unique to each library (an *Aerococcus* spp. strain identified in whole flies and a *Corynebacterium variabile* strain identified in midguts) and two common dominant species (*Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus plantarum*) (Table 1). These latter species were previously found to be associated with adult *Drosophila* intestines and are likely to be commensal with *Drosophila* (Cox and Gilmore, 2007; Ryu et al., 2008). We then tested whether *L. plantarum* and *E. faecalis* have the ability to colonize *Drosophila* gut. To this end, GF embryos were cultured on rich or poor medium supplemented with 10^8 cfu of either bacterial

Table 1. Bacterial Species Associated with Our Conventionally Reared Wild-Type Fly Strain

CRyw Whole Body Library		
Phylotype	Closest strain	% identity
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	99%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	99%
<i>Aerococcus</i> spp.	<i>Aerococcus viridans</i> ATCC11563	97%
CRyw Adult Midgut Library		
Phylotype	Closest strain	% identity
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	99%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	99%
<i>Corynebacterium variabile</i>	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM20132	98%

species, and internal bacterial loads were quantified at different developmental stages following this inoculation (Figures 2A and S1A). One day after the inoculation, both *L. plantarum* and *E. faecalis* were detected in larvae, suggesting that both species can colonize young larvae. However, kinetics between *L. plantarum* and *E. faecalis* began to diverge the following day. *L. plantarum* load kept on increasing during larval development, whereas *E. faecalis* titers constantly dropped down, ultimately reaching an undetectable level at late larval stage (Figures 2A and S1A). These data suggest that *L. plantarum*, unlike *E. faecalis*, has the ability to remain associated with *Drosophila* long after an initial colonization. The fact that similar *L. plantarum* quantities were found in whole individuals and in dissected midguts demonstrates that *L. plantarum* resides in the midgut after colonization (Figures 2B, 2C, and S1B). Finally, we tested whether the presence of *L. plantarum* in the gut required constant reassociation by feeding on contaminated medium. To this end, young larvae colonized by *L. plantarum* were surface sterilized and transferred to GF culture medium. The bacterial loads of larvae as well as the bacterial load on the medium were quantified over time. In this experimental setting, *L. plantarum* titers were similar to those observed in nontransferred larvae. In addition, *L. plantarum* was able to efficiently recolonize the medium (Figures 2D, 2E, S1C, and S1D). These results demonstrate that *L. plantarum* remains associated with its host upon transfer and that larval gut-derived *L. plantarum* has the ability to recolonize the entire larval niche upon transfer. Although these results highlight the commensal behavior of *L. plantarum* and *Drosophila* larvae, we cannot exclude that *L. plantarum* is constantly recolonizing its host by repeated ingestion. Taken collectively, these results reveal the potent ability of *L. plantarum* to efficiently colonize the whole larval niche, including its host midgut and the external media, and to resist the passage through the digestive tract of its host.

***L. plantarum* Recapitulates Conventional Microbiota Association**

We next asked whether the parameters of the *Drosophila* monoassociation with *L. plantarum* (kinetics of persistence and internal loads) mirror those of indigenous bacteria in CR individ-

uals. Indeed, *L. plantarum* loads fluctuated in between different developmental stages but in a very stereotyped and reproducible manner. *L. plantarum* loads constantly increase during the larval stages, reaching a maximum at midpupal stage (Figure 2A). This was followed by a dramatic fall during late metamorphosis and by a reassociation upon adult emergence, illustrated by an increasing amount of bacteria during the adult life (Figure 2A). Similar kinetics of the whole bacterial population persistence and loads were observed during the larval, pupal, and early adult stages of CR individuals (Figure 2G). In contrast, internal bacterial loads following adult emergence were slightly different between *L. plantarum*-associated and CR adults (Figures 2A and 2H). Since vertical transfer is a hallmark of the natural process of microbiota acquisition, we tested whether *L. plantarum* could be efficiently transmitted from the parents to their progenies. As shown in Figure 2F, *L. plantarum* loads and kinetics of persistence in progenies of *L. plantarum*-associated parents followed the same pattern as the one observed in artificially *L. plantarum*-associated flies or as the whole bacterial population in CR flies (Figures 2A, 2F, and 2G). Taken together, these experiments demonstrate that the protocol used to associate GF individuals with *L. plantarum* faithfully recapitulates a natural pattern of bacterial colonization of CR individuals, at least during larval, pupal, and early adult stages.

***L. plantarum* Association Sustains Larval Development upon Nutrient Scarcity**

Having demonstrated that *L. plantarum* colonizes the larval niche as a natural microbiota, we tested whether *L. plantarum* on its own sustains the development of larvae raised on poor-nutrient media. *L. plantarum* association in poor-condition medium was sufficient to accelerate larval growth and resulted in earlier emergence of adults (Figures 3A and 3B; Table S1). This effect was not observed in rich-medium condition (Figures 3A and 3B). This growth-promoting effect, which was observed in different poor-medium conditions, results in a reduction of all three larval instars (Figures 3C and 3D). Strikingly, the presence of *L. plantarum* was sufficient to allow development of larvae in the complete absence of yeast extract, a condition that normally led to lethality of GF late first instar larvae (Figure 3C). Importantly, this beneficial effect was neither observed upon colonization of GF larvae with another bacterial species, *E. faecalis*, which does not persist in its host, nor with another strain of *L. plantarum* isolated in our lab and fully capable of colonizing the larvae and the medium (Figures 3A, 3B, and 3E–3H). Importantly, several other strains of *L. plantarum* isolated independently from flies cultivated in our or other labs are beneficial, as well as the reference *L. plantarum* strain, whose genome is sequenced (data not shown; Figures S2 and S4). This suggests that many *L. plantarum* strains exert a specific effect on systemic larval growth that is not a mere trophic effect of adding organic matter to the fly medium, but rather relies on a specific biological activity of these strains. Finally, we show that the beneficial effect of *L. plantarum* on the developmental timing is also vertically transmitted from *L. plantarum*-associated parents to their progenies (Figure 3I). Altogether, these observations demonstrate that association with several strains of *L. plantarum* accelerates larval development upon nutrient scarcity and results in an earlier emergence of adults compared to GF animals. These data reveal

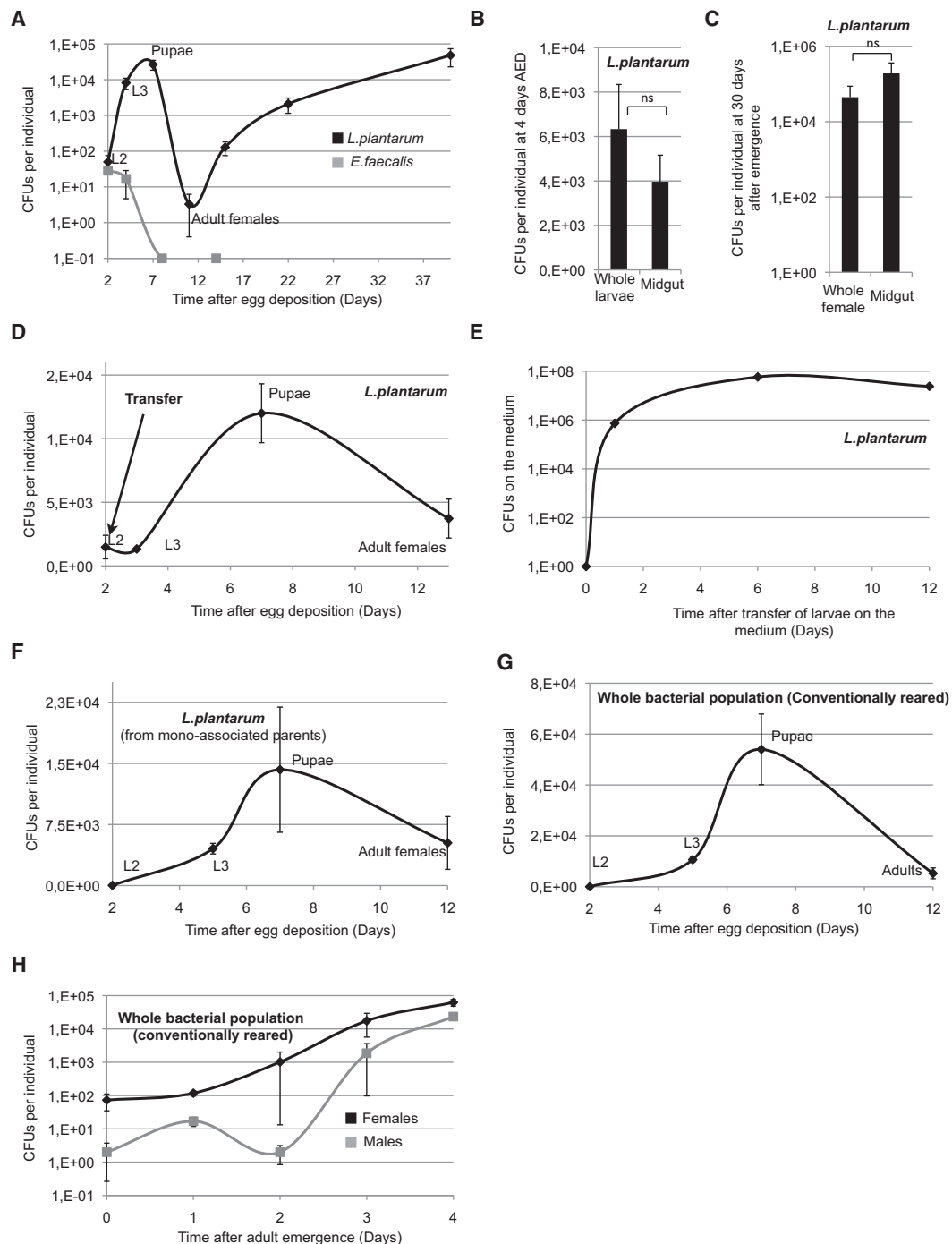


Figure 2. *Lactobacillus plantarum* Association Recapitulates Conventional Microbiota Association

(A) Internal bacterial load of germ-free *Drosophila* individuals after contamination of the fly medium with *E. faecalis* (gray) or *L. plantarum* (black). (B and C) Internal and midgut load of *L. plantarum* in larvae collected 4 days after egg deposition (AED) (B) or adults collected 30 days after emergence (C). (D) Internal bacterial load of *Drosophila* individuals colonized with *L. plantarum* at day 1 AED and transferred to germ-free medium after surface sterilization at day 2 AED. (E) Fly medium bacterial load after transfer of surface-sterilized *L. plantarum*-associated larvae. (F) Internal bacterial load of the progenies of *Drosophila* adults monoassociated with *L. plantarum*. (G and H) Internal load of the whole bacterial population of conventionally reared *Drosophila* individuals after egg deposition (G) and female (black) or male (gray) emergence (H). All experiments were performed on rich diet. Each graph represents the mean of three biological replicates $\pm$ SEM. Bacterial load is illustrated as the colony forming units (cfu). Developmental stages of individuals are indicated on the graphs. For (B) and (C), statistical significance of the results is included (Student's *t* test, ns $p > 0.05$).

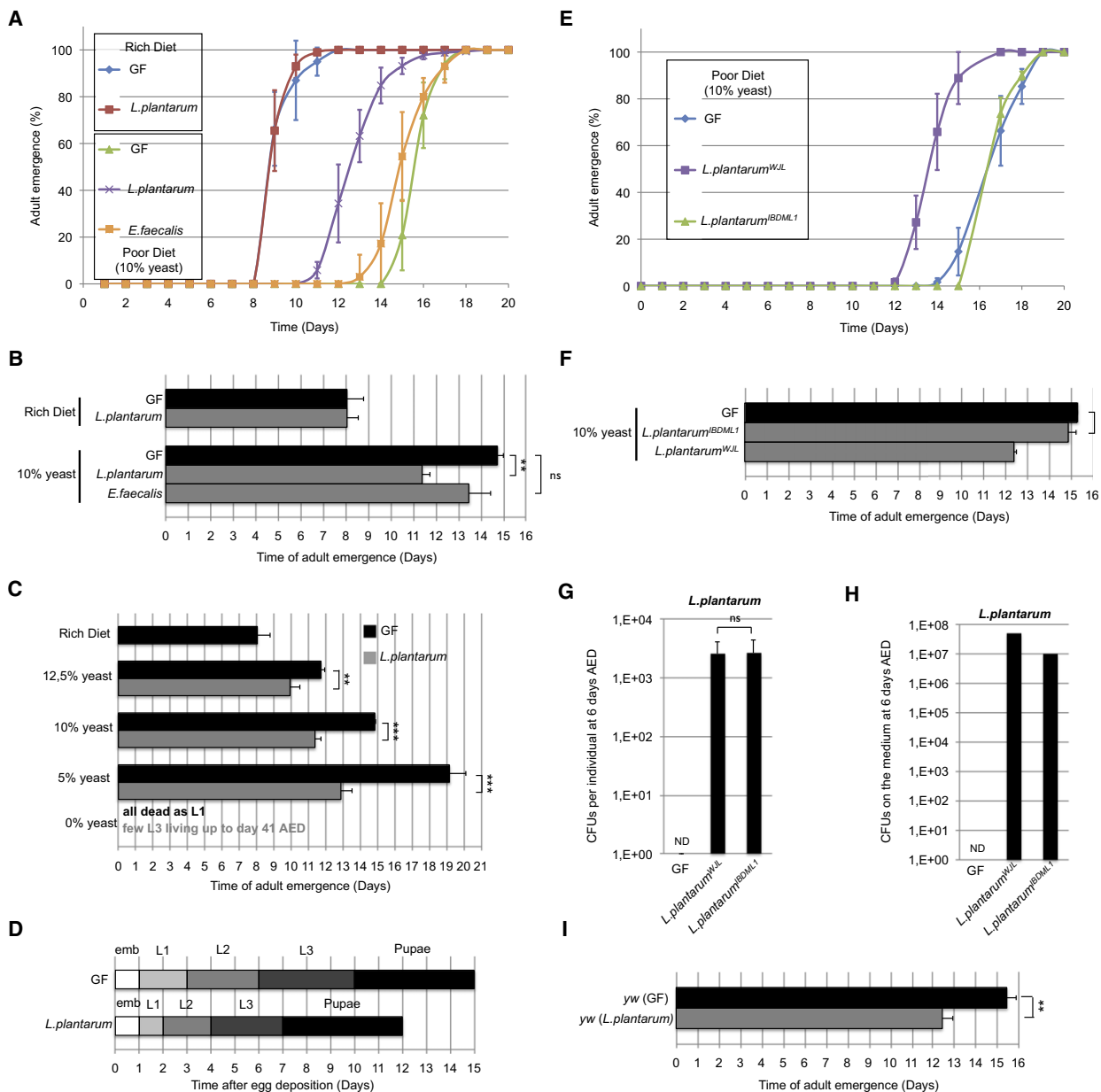


Figure 3. *L. plantarum* Association Sustains Larval Development upon Nutrient Scarcity

(A) Developmental timing of germ-free (GF), *L. plantarum*-, or *E. faecalis*-associated individuals grown on either rich or poor diet. The cumulative percentage of the adult population emergence is shown over time. Data represent the mean of three biological replicates containing at least 30 individuals each $\pm$ SEM.

(B) Mean time of the emergence of 10% of the whole germ-free, *L. plantarum*-, or *E. faecalis*-associated adult population grown on either rich or poor diet (10% yeast).

(C) Mean time of the emergence of 10% of the whole germ-free or *L. plantarum*-associated adult population grown on rich or poor diets containing, respectively, 12.5%, 10%, 5%, or 0% of the yeast extract content of a rich diet.

(D) Time of appearance of the first germ-free (GF) or *L. plantarum*-associated individuals at each different developmental stage when grown on poor diet (10% yeast).

(E) Developmental timing of germ-free (GF), *L. plantarum*^{WJL}- or *L. plantarum*^{BDML1}-associated individuals grown on poor diet. The cumulative percentage of the adult population emergence is shown over time. Data represent the mean of three biological replicates containing at least 30 individuals each $\pm$ SEM.

(F) Mean time of the emergence of 10% of the whole germ-free, *L. plantarum*^{WJL}- or *L. plantarum*^{BDML1}-associated adult population grown on poor diet (10% yeast).

(G and H) Internal larval (G) and fly medium (H) load of *L. plantarum* 6 days AED upon association with *L. plantarum*^{WJL} or *L. plantarum*^{BDML1}.

(I) Mean time of the emergence of 10% of the F1 adult population of GF or *L. plantarum*-associated parents grown on poor diet (10% yeast). For (B), (C), (F), and (I), gray is *L. plantarum*-associated and black is GF condition. Statistical significance of the results is included (Student's t test, ns $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). For (G) and (H), ND: not detected.

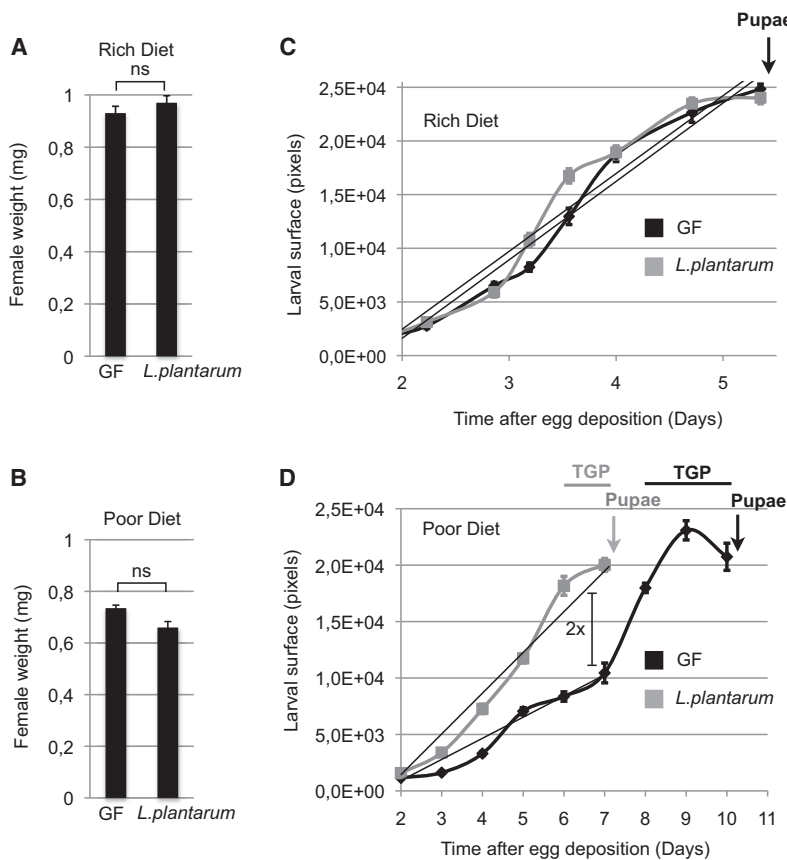


Figure 4. *L. plantarum* Association Promotes Larval Growth Rate

(A and B) Weight of 3-day-old GF or *L. plantarum*-associated females emerging from individuals grown either on rich (A) or poor diet (10% yeast) (B). Statistical significance of the results is included (Student's *t* test, ns $p > 0.05$).

(C and D) Larval surface of GF (black) or *L. plantarum*-associated (gray) larvae over time when grown on rich (C) or poor diet (10% yeast) (D). Linear regression curves are included (GF/rich diet, $y = 7254x - 12,051$; *L. plantarum*/rich diet, $y = 7308.5x - 13,006$; GF/poor diet, $y = 2013x - 3736$; *L. plantarum*/poor diet $y = 4029x - 7771$). A 2-fold increase in the growth rate of *L. plantarum*-associated larvae is illustrated, as well as the terminal growth periods (TGPs) and time of pupae emergence in each condition.

ciation enhances systemic growth upon nutrient scarcity by promoting larval growth rate and reducing the duration of the growth period.

***L. plantarum* Association Correlates with Enhanced Hormonal Growth Signaling**

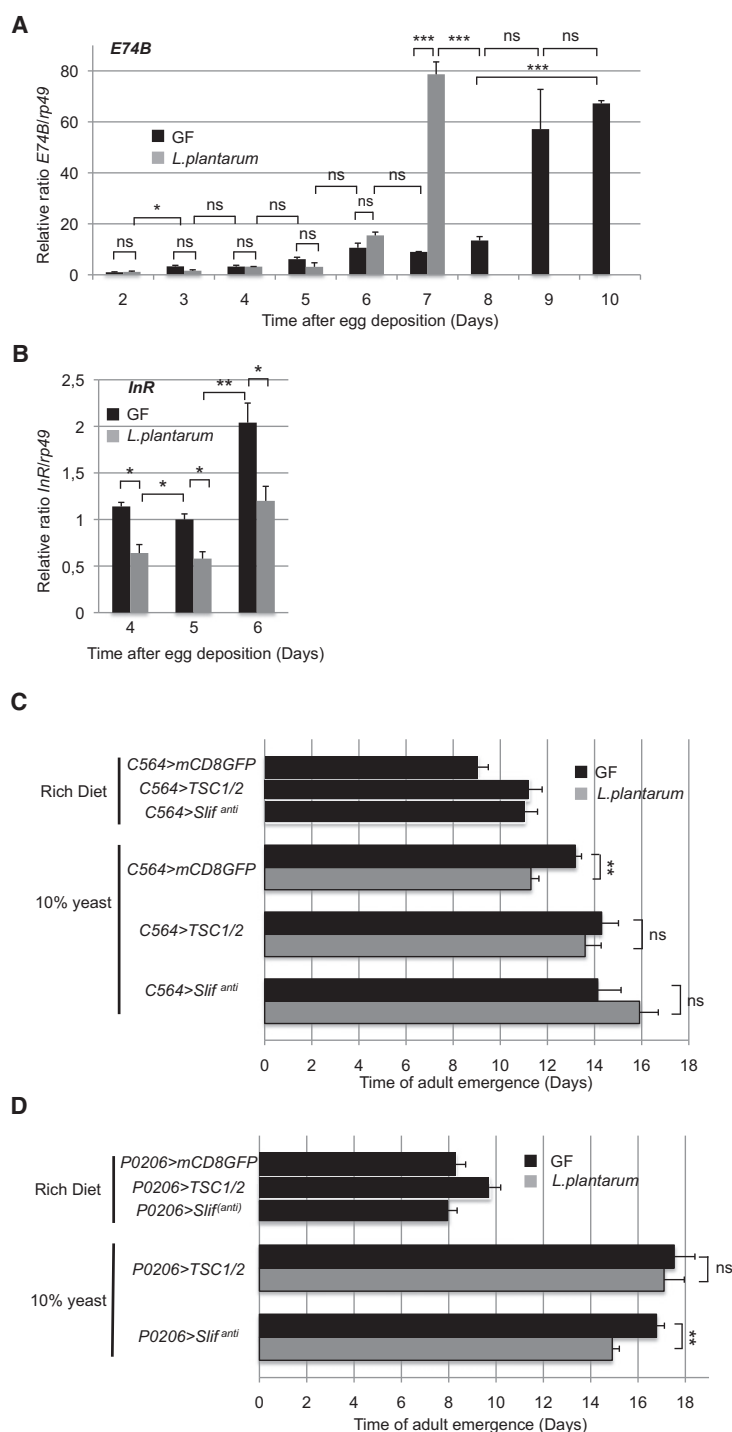
In *Drosophila*, the duration of the larval period and the larval growth rate are controlled by two circulating hormones: the steroid hormone Ecdysone (Ecd) and the *Drosophila* insulin-like peptides (dILPs), respectively (Hietakangas and Cohen, 2009). To test if the presence of *L. plantarum* directly impacts these growth signals, we compared the levels of molecular

that some strains of a single *Drosophila* commensal bacterial species, *L. plantarum*, are sufficient to recapitulate the beneficial effect of a naturally acquired microbiota.

***L. plantarum* Promotes Larval Growth Rate**

To further characterize how *L. plantarum* impacts larval growth, we analyzed the final adult size, a parameter that is directly dependent on the larval growth phase. To this end, we compared the weight of young adults appearing from larvae raised on GF or *L. plantarum*-contaminated media. As for the length of the larval stages, we did not observe any significant differences in the weight of adults developing from GF and *L. plantarum*-associated larvae grown on rich diet (Figure 4A). Similarly, when larvae were grown on poor medium, no significant difference was observed between GF and *L. plantarum*-associated individuals (Figure 4B). However, adults developing from either GF or *L. plantarum*-associated larvae grown on poor diet were lighter than individuals grown in rich conditions (Figures 4A and 4B). Given that *L. plantarum* reduces the length of the growth phase without affecting the final size of the individual, we hypothesized that *L. plantarum* increases the larval growth rate. To test this, we compared the size of *L. plantarum*-associated versus GF larvae from L1 larvae to pupae. Data presented in Figures 4C and 4D clearly show a 2-fold increase in the growth rate of *L. plantarum*-associated larvae raised on a poor diet, whereas no impact on the growth rate is observed when larvae are raised on a rich diet. These results demonstrate that *L. plantarum* asso-

ciation enhances systemic growth upon nutrient scarcity by promoting larval growth rate and reducing the duration of the growth period. *L. plantarum* association correlates with enhanced hormonal growth signaling. In *Drosophila*, the duration of the larval period and the larval growth rate are controlled by two circulating hormones: the steroid hormone Ecdysone (Ecd) and the *Drosophila* insulin-like peptides (dILPs), respectively (Hietakangas and Cohen, 2009). To test if the presence of *L. plantarum* directly impacts these growth signals, we compared the levels of molecular readouts of these signals in GF and *L. plantarum*-associated larvae. The expression of the transcription factor *E74B*, one of the "early" genes that responds to increasing Ecd titers, is classically used as a molecular marker of Ecd activity (Karim and Thummel, 1991). Figure 5A shows that *L. plantarum* association did not increase the *E74B* mRNA levels until day 7 AED; however, from then *E74B* mRNA levels sharply peaked in *L. plantarum*-associated larvae, while the peak was less acute and delayed in GF larvae. Of note, in GF larvae *E74B* mRNA levels were already increased (albeit with low statistical significance) at day 9 AED, but no larvae pupariated at this time point (pupariation started at day 11 AED, Figure 3D). These results indicate that *L. plantarum* association correlates with an earlier and stronger Ecd peak in third instar larvae. We then used the *InR* gene expression as a readout for systemic dILP activity. Indeed, the *InR* gene transcription is under the direct negative regulation of the *InR* signaling pathway via the activity of the FoxO transcription factor. *InR* expression is therefore used as a negative molecular marker of systemic dILP activity: low *InR* expression correlating with high dILP activity (Puig and Tjian, 2005). As shown in Figure 5B, *InR* expression was always lower in *L. plantarum*-associated larvae than in GF larvae. These results show that *L. plantarum* association correlates with increased systemic *InR* signaling during larval growth. Taken together, our observations support the notion that *L. plantarum* association, albeit with distinct kinetics, enhances the systemic production of two hormonal growth signals.



***L. plantarum* Effect on Growth Requires Optimal TOR Activity**

In *Drosophila*, TOR pathway modulates hormonal signals regulating larval growth in a tissue-specific manner (Hietakangas and Cohen, 2009). While TOR directly controls Ecd production by the prothoracic gland during the mid-third larval instar (Layalle et al., 2008), the regulation of InR signaling is more

Figure 5. *L. plantarum* Enhances TOR Activity via Increased Nutrient Sensing

(A) *E74B* mRNA levels from day 2 AED to day 10 AED in GF (black) or day 2 AED to day 7 AED for *L. plantarum*-associated larvae (gray) grown in poor condition (10% yeast). The RT-qPCR value of the relative $\Delta Ct^{E74B}/\Delta Ct^{rpd49}$ ratios is represented for each day AED, and the $\Delta Ct^{E74B}/\Delta Ct^{rpd49}$ ratio calculated for GF larvae at day 2 AED was anchored to 1 to indicate fold induction.

(b) *Inr* mRNA levels from day 4 AED to day 6 AED in GF (black) and *L. plantarum*-associated larvae (gray) grown in poor condition (10% yeast). Relative $\Delta Ct^{Inr}/\Delta Ct^{P49}$ ratios are represented, and the $\Delta Ct^{Inr}/\Delta Ct^{P49}$ ratio calculated for GF larvae at 5 days AED was anchored to 1 to indicate fold induction.

(C) Mean time of the emergence of 10% of the whole germ-free (black) or *L. plantarum*-associated (gray) adult population grown on either rich or poor diet (10% yeast). Genotype tested were: (1) w;C564-GAL4/UASmCD8::GFP (C564 > mCD8GFP), (2) w;C564-GAL4/UAS-TSC1,UAS-TSC2 (C564 > TSC1/2), and (3) w;C564-GAL4/UAS-Sifant (C564 > Sifant).

(D) Mean time of the emergence of 10% of the whole germ-free (black) or *L. plantarum*-associated (gray) adult population growth on either rich or poor diet. Genotype tested were: (1) w;P0206-GAL4,UASmCD8::GFP/UASmCD8::GFP (P0206 > mCD8GFP), (2) w;P0206-GAL4,UASmCD8::GFP/UAS-TSC1,UAS-TSC2 (P0206 > TSC1/2), and (3) w;P0206-GAL4,UASmCD8::GFP/UAS-*Slim^{anti}* (P0206 > *Slim^{anti}*). Statistical significance of the results is included (Student's t test, ns p > 0.05; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

complex and implicates cross-talks between different tissues. It has been shown that systemic InR signaling is regulated by a remote control of dILP secretion by neurons through TOR activity in the fat body (Colombani et al., 2003; G  minard et al., 2009). Since our results suggest that *L. plantarum* association impacts both InR and Ecd signaling in larvae, we wondered whether the TOR pathway mediates these effects. To test this hypothesis, we analyzed the impact of reduced TOR kinase activity on *L. plantarum*-mediated benefit using a mild and tissue-specific expression of TSC1 and TSC2, two negative regulators of TOR (Tapon et al., 2001). The developmental timing of larvae in which TSC1 and TSC2 were selectively expressed in the fat body (by using *ppl*-GAL4 or C564-GAL4 drivers) was no longer influenced by the presence of *L. plantarum*. Indeed, adult emergence timing of *L. plantarum*-associated and GF individuals with reduced TOR activity were identical (Figure 5C; Supplemental Information and Figure S3). Using the P0206-GAL4 driver, we reduced TOR kinase activity specifically in the prothoracic gland (Layalle et al., 2008). As observed for the fat body, TSC1 and expression in this organ also abolished the beneficial *L. plantarum* on the timing of adult emergence (Figure Supplemental Information and Figure S3). Taken together, these experiments demonstrate that optimal TOR activity is required in both fat body and prothoracic gland to enhance systemic growth upon *L. plantarum* association.

***L. plantarum* Effect on Growth Relies on the Host Nutrient Sensing System**

Diet-derived branched-chain amino acids are the main activators of TOR kinase activity (Avruch et al., 2009). However, the precise molecular mechanisms responsible for amino acid sensing remain elusive. In *Drosophila*, genetic studies have implicated the product of the *slimfast* gene in the regulation of TOR kinase activity in the fat body (Colombani et al., 2003). Silencing *slimfast* expression selectively in this tissue causes a systemic growth defect similar to what is seen in *Drosophila* raised under poor nutritional conditions or TOR inhibition (Colombani et al., 2003) (Figure 5C; Supplemental Information and Figure S3). *Slmfast* encodes a transporter involved in the intracellular uptake of diet-derived circulating amino acids, suggesting that TOR activity in the fat body is regulated by the availability of these micronutrients (Colombani et al., 2003). Using UAS-*slif* antisense transgene and fat body or prothoracic gland GAL4 drivers, we tested the consequence of *slif* inactivation on the beneficial effect mediated by *L. plantarum* association on its host developmental timing. Figures 5C and 5D show that the selective extinction of *slif* in the fat body severely impacts this process, demonstrating that *L. plantarum* association requires a fully functional host nutrient sensing system to promote systemic growth.

DISCUSSION

Our results establish the importance of the *Drosophila* microbiota to sustain larval development upon nutrient scarcity. They emphasize the role of the microbiota in the adaptation of its host to different nutritional conditions that can be encountered in the wild and support the hologenome theory of evolution (Fraune and Bosch, 2010; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). This theory posits that the holobiont (the host plus its associated micro-organisms) acts as a unit of selection in evolutionary change and that commensal microbes, thanks to their genetic wealth, may play an important role in both adaptation and evolution of metazoans to their environment (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). Indeed, we demonstrate that the fly microbiota confers optimal adaptation to its environment and that this beneficial effect is transferred from one generation to the other. Both characteristics are essential for the ecological and evolutionary success of a given species. Together with the recent indication that commensal bacteria influence *Drosophila* mating preference (Sharon et al., 2010), our results highlight the key role of the *Drosophila* microbiota to its host biology.

The two major bacterial species identified in our *Drosophila* strain (*Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecalis*) were previously identified in commensal communities of lab-reared or wild-captured *Drosophila* (Corby-Harris et al., 2007; Cox and Gilmore, 2007; Ren et al., 2007; Ryu et al., 2008; Sharon et al., 2010). We did not find Acetobacteraceae species, although they were found in previous studies. This could be due to fly food composition favoring selection of specific bacterial strains. Our fly food, which does not contain simple sugars but starch as a carbohydrate source, could also explain the limited number of bacterial species found associated with flies. Indeed, Sharon et al. have recently shown that flies reared on

starch medium hold low microbiota diversity with the dominance of *Lactobacillus plantarum* and the absence of Acetobacteraceae, while flies reared on molasses medium show higher diversity and contain Acetobacteraceae (Sharon et al., 2010).

We show that unlike *E. faecalis*, *L. plantarum* has the potent ability to reside in the *Drosophila* intestine and to be vertically transmitted to its progenies. This ability most likely stems from the extreme flexibility and versatility of this bacterial species. Indeed, *L. plantarum* is encountered in a variety of environmental niches, including dairy, meat, and vegetable or plant fermentations and is a natural inhabitant of the human mouth, intestine, and vagina. Of note, *L. plantarum* is the most common bacterium used in silage inoculants, and a selected strain, *L. plantarum*^{299v}, is marketed as a probiotic supposed to confer various health benefits to the consumer. The ecological flexibility of *L. plantarum* is reflected by the observation that this species has one of the largest genomes known among lactic acid bacteria and is equipped with a large number of genes encoding regulatory, transport, and extracellular proteins (Kleerebezem et al., 2003).

Strikingly, we reveal that monoassociation of young GF larvae with *L. plantarum* mirrors bacterial colonization patterns seen upon vertical transfer or upon colonization by a natural microbiota (i.e., in CR conditions). The colonization pattern revealed in this study strictly correlates with the ones described in past reports (Bakula, 1969; Ren et al., 2007). This robust ability of *L. plantarum* to colonize and reside in its host actually suggests that this bacterial strain is adapted to occupy the intestinal niche of *Drosophila* individuals. Taken collectively, our results reveal that *L. plantarum* monoassociation is a faithful gnotobiotic model to address the functional impact of a unique commensal strain to its host physiology. Hence, we demonstrate that *L. plantarum* sustains larval development upon nutrient scarcity and recapitulates, on its own, the effect of a natural microbiota. This reveals that, at least for *Drosophila* systemic growth, a single bacterial species can recapitulate the beneficial effect of a more complex natural microbiota.

We next wondered how *L. plantarum* exerts its growth-promoting effect. Since the hallmark of *L. plantarum* metabolic activity is the massive production of lactic acid from homofermentation of sugars (Ferain et al., 1996), we tested whether *L. plantarum* strain producing lower amounts of lactate was still beneficial for the host. Indeed, lactic acid or lactate in its reduced form is a particularly mobile fuel for aerobic metabolism, and recent evidence reveals that eukaryote lactate dehydrogenase produces pyruvate that in turn fuels the mitochondrial Krebs cycle to produce energy (Gladden, 2004). The fact that a strain of *L. plantarum* that was genetically engineered to produce minute amounts of lactate was still fully beneficial suggests that lactate production is not a limiting activity of *L. plantarum* to sustain larval growth (Figure S4). Several lines of evidence support the notion that *L. plantarum* is not acting via a diet-derived sugar metabolism, but rather by promoting protein assimilation by the host. First, numerous publications have previously established that *Drosophila* systemic growth is influenced by nutrient availability and more specifically by the protein content of the diet (Layalle et al., 2008). Second, the benefit of *L. plantarum* association for its host growth is only revealed upon nutrient scarcity, but not in rich-diet

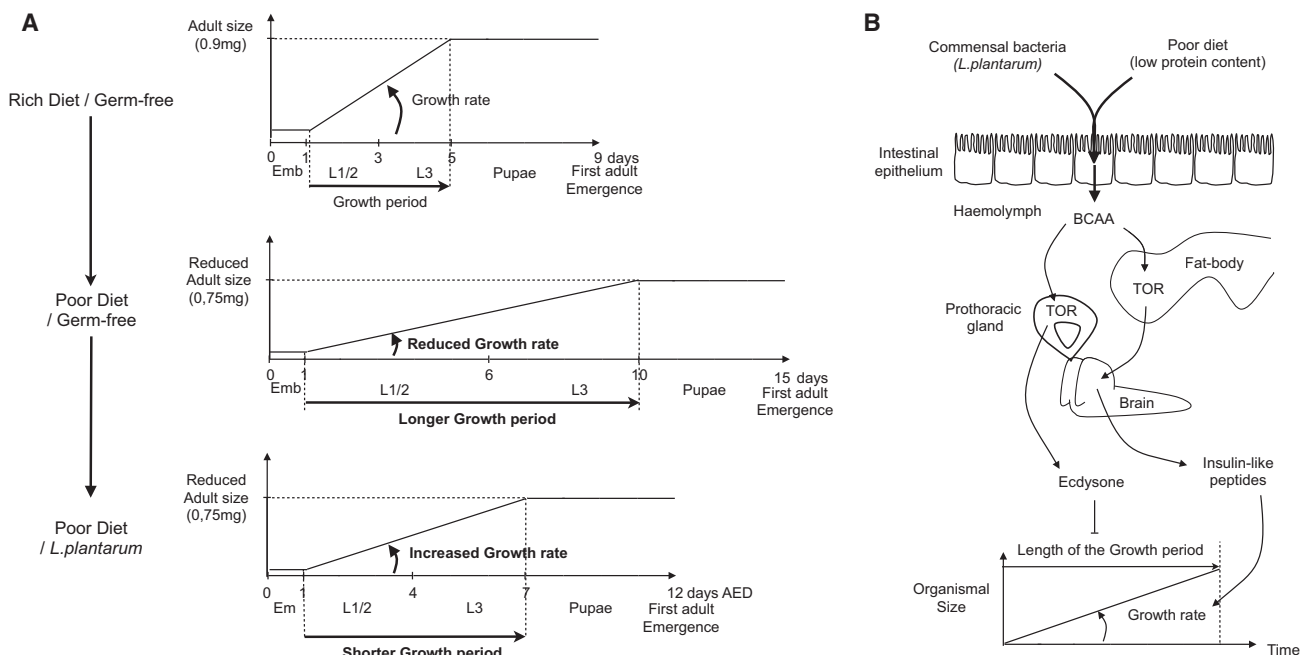


Figure 6. Model of the Impact of *L. plantarum* Association on Host Systemic Growth Parameters upon Nutrient Scarcity

(A) Both nutrient contents of the diet and *L. plantarum* association influence the larval growth rate and the length of the growth period, two parameters controlling the adult final size. The reduction of the yeast content in the diet reduces the growth rate and increases the length of the growth period. On a poor diet, the association of larvae with *L. plantarum* increases the growth rate and reduces the length of the growth period. As a consequence, those individuals more quickly reach the optimal size to develop into viable adults.

(B) *L. plantarum* association promotes protein assimilation from the diet, optimizing diet-derived branched-chain amino acid (BCAA) levels in the hemolymph. This in turn stimulates TOR kinase activity in the fat body, leading to increased *Drosophila* insulin-like peptides production by the brain. The dILPs, released in the hemolymph, increase systemic InR signaling and promote growth rate. In parallel, increased levels of BCAA activate TOR kinase activity in the prothoracic gland, which potentiates Ecdysone production during late larval stage and impacts on the length of the growth phase. This integrated action of hormonal signals via increased TOR activity leads to optimal systemic larval growth upon nutrient scarcity.

condition, which in our case is very concentrated in proteins compared to other fly food recipes (http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/media-recipes.htm). Moreover, the *L. plantarum*-mediated benefit is only observed upon reduction of the yeast extract content, but not of the cornmeal in the culture medium (data not shown). Of note, in our fly food, the yeast extract is the main protein source. In addition, *L. plantarum* association is not able to sustain growth of *Drosophila* larvae on an agar/banana/grape media, which contains high titers of simple and complex sugars but less than 1% of protein (data not shown), while it can sustain larval growth on an agar/cornmeal medium in absence of yeast extract, which still contains proteins from cornmeal but low titers of simple sugars (Figure 3C). Finally, we show that on the same poor diet (10% yeast), *L. plantarum* association impacts its host developmental timing, similar to the mere addition of 2.5% yeast extract to the poor diet of GF larvae (Figure 3C, compare timing of emergence of GF on 10% yeast to GF on 12.5% yeast and *L. plantarum* on 10% yeast). Taken collectively, these data imply that *L. plantarum* exerts its beneficial effect through enhanced protein assimilation.

This notion is further supported by our functional data, which demonstrate that the host TOR kinase activity and the amino acid transporter Slimfast are essential for *L. plantarum* beneficial effect on growth. These molecules participate to the host nutrient sensing system, which governs *Drosophila* systemic

growth (Hietakangas and Cohen, 2009). Our functional data demonstrate that *L. plantarum* exerts its beneficial effect on systemic growth genetically upstream of this host amino acid sensing system. Interestingly, optimal TOR activity is required both in the fat body and the prothoracic gland, two key endocrine tissues, to allow *L. plantarum* association to promote growth. Actually, TOR activity in the fat body controls larval growth rate by influencing systemic InR signaling (Colombani et al., 2003), while TOR activity in prothoracic gland influences the duration of the growth phase by controlling the length of the terminal growth period (TGP) through the regulation of Ecd production at late larval stage (Layalle et al., 2008). Accordingly, we show that both parameters are influenced by *L. plantarum* association upon nutrient scarcity: the host growth rate is enhanced and the TGP is reduced (see Figure 4), and thus both systemic InR signaling and Ecd production are modified upon *L. plantarum* association. The observed *E74B/InR* expression patterns and the TOR dependence again support a simple model where *L. plantarum* association enhances protein assimilation from the food by the larvae. Taken collectively, our results reveal that *L. plantarum* influences both growth parameters, leading to an optimal systemic larval growth on a poor diet and allowing individuals to reach sooner the critical size needed to pupariate and form viable adults (Figure 6). Based on these results, we propose the following model where *L. plantarum* association

with its host promotes protein assimilation from the diet, optimizing diet-derived branched-chain amino acid levels in the hemolymph. This in turn stimulates TOR kinase activity both in the fat body and the prothoracic gland. In the fat body, TOR activity optimizes systemic InR signaling and promotes growth rate, while in the prothoracic gland, TOR potentiates Ecd production during late larval stage to reduce the length of the growth phase. This integrated action on hormonal signals via increased TOR activity leads to optimal systemic growth (Figure 6). Importantly, our results suggest that in addition to influencing host energy uptake, the microbiota, at least in *Drosophila*, can promote host systemic growth by influencing nutrient sensing system, controlling hormonal signals through enhanced nutrient assimilation. We therefore propose that the microbiota should not be considered only as a “host” factor influencing energy uptake, but should also be deemed as a “host” factor influencing growth. Finally, since microbiota-mediated growth-promoting effect in flies can be recapitulated by a single lactic acid bacterial species, it would be of great interest to test whether in mammals, in which lactic acid bacteria have been used for decades as alimentary complements in the farming and agroalimentary industry, these bacteria favor the systemic production of growth-promoting hormones.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Drosophila Stocks and Breeding

Drosophila stocks were cultured at 25°C on a yeast/cornmeal medium (rich diet). For 1 l of food, 8.2 g agar (VWR, cat. #20768.361), 80 g cornmeal flour (Westhove, Farigel maize H1), and 80 g yeast extract (VWR, cat. #24979.413) were cooked for 10 min in boiling water; 5.2 g Methylparaben sodium salt (MERCK, cat. #106756) and 4 ml of 99% propionic acid (CARLO ERBA, cat. #409553) were added when the food had cooled down. Poor-nutrient food was obtained by reducing the amount of yeast extract to 12.5% (10 g/l), 10% (8 g/l), 5% (4 g/l), or no yeast extract. Fresh food was prepared every week to avoid desiccation, and no yeast paste was added to the medium. CR stocks carry a conventional microbiota, which was removed in GF individuals by bleaching and cultivating embryos on autoclaved conventional medium. GF stocks were maintained on a rich diet supplemented with a cocktail of four antibiotics (Ampicillin/Kanamycin/Tetracycline/Erythromycin at 50 µg/ml final each). *Drosophila yw* flies were used as the reference strain in this work. The following GAL4 drivers were used: C564-GAL4 (Harrison et al., 1995) and *ppl*-GAL4 (Colombani et al., 2003) for mild larval fat body expression and P0206-GAL4 for mild prothoracic gland expression (Janning, 1997). The following UAS transgenes were used: UAS-*mCD8::GFP* (Bloomington stocks #5137), UAS-*TSC1*, UAS-*TSC2* (Tapon et al., 2001), and UAS-*Slit^{anti}* (Colombani et al., 2003). All crosses were performed using GF stocks at 25°C on our conventional medium supplemented with antibiotics. Mated GF females were transferred on appropriate medium for egg laying, followed by bacterial association at day 1 AED.

Bacterial Strains

Apart from the *Lactobacillus plantarum*^{WCF51}, which is a sequenced strain isolated from human saliva (Kleerebezem et al., 2003), all the other *L. plantarum* strains used in this study have been isolated from lab-raised flies: *L. plantarum*^{WJL} in Won-jae Lee's lab (Seoul), *L. plantarum*^{cnw10} in Angela Douglas' lab (Ithaca, NY), and *L. plantarum*^{NAB} in Bruno Lemaitre's lab (Lausanne). *L. plantarum*^{IBDML1} has been isolated from a 20-day-old CRYw female upon plating of serial dilutions of the fly homogenate on nutrient agar plates. Single colonies were recovered and species identification was performed by sequencing 16S rRNA gene amplicons. We recovered 30 distinct isolates of *L. plantarum*, all sharing more than 98% identities on their full-length 16S DNA sequences, from which we identified *L. plantarum*^{IBDML1} as being capable of colonizing the whole larval niche but unable to promote larval growth upon

nutrient scarcity. This strain has a growth rate in MRS media similar to beneficial *L. plantarum* strains (data not shown). All the experiments were performed using the *L. plantarum*^{WJL} strain unless otherwise stated. For *E. faecalis* association, we used the *E. faecalis* JH2-2 Rifampicin^r strain (Hols et al., 1992). All *L. plantarum* strains were grown overnight at 37°C standing in Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (BD Bioscience), and *E. faecalis* was grown overnight at 37°C under agitation in Brain Heart Infusion (BHI) broth (BD Bioscience) supplemented with 50 µg/ml rifampicin. Heat inactivation of bacterial culture was achieved by incubating bacterial culture (OD₆₀₀ = 1) for 10 min at 100°C. The *L. plantarum* *ldhD*⁻, *ldhL*⁻ strain produces minute amounts of lactate and has been described previously (Ferain et al., 1996).

Monoassociation of GF Individuals

GF females laid GF embryos on appropriate culture medium (rich or poor GF diets). Bacterial culture (150 µl, OD₆₀₀ = 1) was then added directly on the embryos and the fly food after the egg-laying period. Emerging larvae were allowed to develop on the contaminated media. For transfer experiments (Figure 2D), larvae were collected 1 day after inoculation of the medium, surface sterilized for 1 min under agitation in 70% EtOH, rinsed in sterile water, and transferred to a fresh GF medium.

Bacterial Load Analysis

Bacterial load of surface-sterilized individuals was quantified by plating serial dilutions of lysates obtained from five individuals (larvae or adults) or five dissected midguts (from larvae or adults) on nutrient agar plates (BHI-rif for *E. faecalis* or MRS for *L. plantarum*). Midguts were isolated from whole dissected guts where the foregut, the hindgut, and the Malpighian tubules were removed. Biological triplicates were collected for each experimental condition. Homogenization of individuals or tissues was performed using the Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, France) and 0.75/1 mm glass beads in 500 µl of the appropriate bacterial culture medium. The *L. plantarum* load on the fly medium after transfer of larvae (Figures 2E and S1D) was quantified by plating several dilutions of 1 ml MRS, previously deposited on the surface of the contaminated fly medium and vortexed thoroughly.

Developmental Timing and Larval and Adult Size Measurements

Developmental timing of individuals raised in different conditions was quantified by counting the number of adults emerging over time. These data were represented either as the cumulative percent of the whole adult population emerging per day or as the day at which 10% of the whole adult population has emerged. Each graph represents the mean of at least three biological replicates, including at least 30 individuals each. Larval stages were identified based on the morphology of mouth hooks and anterior spiracles (Demerec, 1950). Larval size was estimated by collecting and freezing larvae (*n* > 20) every day when grown on poor diet or twice a day (morning and evening) when grown on rich diet after an initial 3 hr period of egg deposition and appropriate bacterial inoculation 24 hr later. Larvae were frozen and mounted in 80% glycerol in PBS. Pictures were taken on a black background using a ProgResC5 CCD camera (JenOptik) mounted on a stereomicroscope. The body surface of each larva was calculated using ImageJ. Masks covering the surface of the larvae were generated using the threshold tool. Surface values were displayed in pixels. Adult size was estimated based on the weight of 3-day-old females. For each condition, the weight of multiple replicates (minimum of three) of a pool of five females was weighed using a precision balance (Mettler Toledo, AG245).

Additional methods are in Supplemental Information available online.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes one table, four figures, Supplemental Text, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cmet.2011.07.012.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Leopold, Jacques Montagne, and Irene Miguel-Aliaga for stimulating discussions; Pierre Leopold, Jacques Montagne, and the

Bloomington Stock Center for fly stocks; Nicolas Gompel and Laurent Arnoult for advice on imaging and image processing; Delphine Boulet, Mélanie Mitchell, and Julien Marini for help with experiments; Corinne Grangette for bacterial strains; Angela Douglas, Bruno Lemaître, and Won-jae Lee for unpublished bacterial strains and communication of results prior to publication; and Bernard Charroux and Benjamin Prud'homme for critical reading of the manuscript. P.H. is a research associate at FNRS. This work was funded by a "2010 ANR Jeune Chercheur" grant to F.L. and an "Equipe labellisée Fondation pour la Recherche Médicale" grant to J.R.

Received: April 4, 2011

Revised: June 24, 2011

Accepted: July 14, 2011

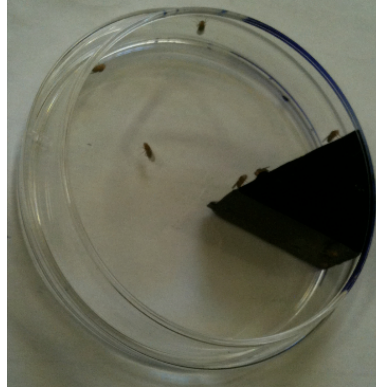
Published: September 6, 2011

REFERENCES

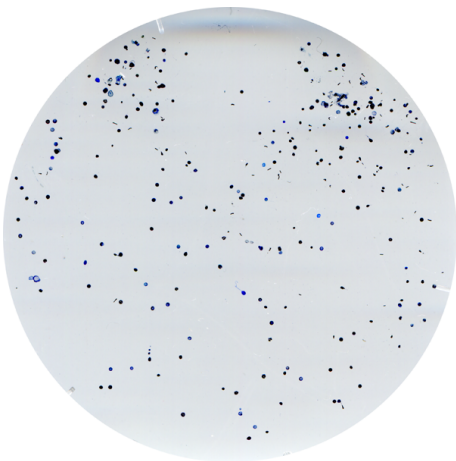
- Avruch, J., Long, X., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., and Dai, N. (2009). Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E592–E602.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Bakula, M. (1969). The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J. Invertebr. Pathol.* 14, 365–374.
- Bocci, V. (1992). The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect. Biol. Med.* 35, 251–260.
- Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A.F., and Benzer, S. (2004). *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12974–12979.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Chakrabarti, S., and Lemaître, B. (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* 23, 2333–2344.
- Burcelin, R., Luche, E., Serino, M., and Amar, J. (2009). The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? *Front. Biosci.* 14, 5107–5117.
- Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1546–1558.
- Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (2000). Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* 68, 6511–6518.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114, 739–749.
- Corby-Harris, V., Pontaroli, A.C., Shimkets, L.J., Bennetzen, J.L., Habel, K.E., and Promislow, D.E. (2007). Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3470–3479.
- Cox, C.R., and Gilmore, M.S. (2007). Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 75, 1565–1576.
- Delzenne, N., and Reid, G. (2009). No causal link between obesity and probiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 901, author reply 901.
- Demerec, M., ed. (1950). *Biology of Drosophila* (New York: John Wiley & Sons, Inc).
- Ehrlich, S.D. (2009). Probiotics - little evidence for a link to obesity. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 901, author reply 901.
- Ferain, T., Hobbs, J.N., Jr., Richardson, J., Bernard, N., Garmyn, D., Hols, P., Allen, N.E., and Delcour, J. (1996). Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178, 5431–5437.
- Fraune, S., and Bosch, T.C. (2010). Why bacteria matter in animal development and evolution. *Bioessays* 32, 571–580.
- Furrie, E. (2006). A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut* 55, 141–143.
- Géminard, C., Rulifson, E.J., and Léopold, P. (2009). Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*. *Cell Metab.* 10, 199–207.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- Gladden, L.B. (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J. Physiol.* 558, 5–30.
- Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M., and Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 14, 2857–2865.
- Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu. Rev. Genet.* 43, 389–410.
- Hols, P., Baulard, A., Garmyn, D., Delplace, B., Hogan, S., and Delcour, J. (1992). Isolation and characterization of genetic expression and secretion signals from *Enterococcus faecalis* through the use of broad-host-range alpha-amylase probe vectors. *Gene* 118, 21–30.
- Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292, 1115–1118.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283–307.
- Janning, W. (1997). FlyView, a *Drosophila* image database, and other *Drosophila* databases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 8, 469–475.
- Karim, F.D., and Thummel, C.S. (1991). Ecdysone coordinates the timing and amounts of E74A and E74B transcription in *Drosophila*. *Genes Dev.* 5, 1067–1079.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1990–1995.
- Layalle, S., Arquier, N., and Léopold, P. (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Dev. Cell* 15, 568–577.
- Lhocine, N., Ribeiro, P.S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Lemaître, B., Gstaiger, M., Meier, P., and Leulier, F. (2008). PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe* 4, 147–158.
- Nelson, K.E., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., Worley, K.C., Creasy, H.H., Wortman, J.R., Rusch, D.B., Mitreva, M., Sodergren, E., Chinwalla, A.T., et al; Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium. (2010). A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science* 328, 994–999.
- O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693.
- Puig, O., and Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev.* 19, 2435–2446.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al; MetaHIT Consortium. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Raoult, D. (2009). Probiotics and obesity: a link? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 616.
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S.E., and Tower, J. (2007). Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off. *Cell Metab.* 6, 144–152.
- Robertson, F.W. (1963). The ecological genetics of growth in *Drosophila* 6. The genetic correlation between the duration of the larval period and body size in relation to larval diet. *Genet. Res.* 4, 74–92.
- Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M., and Lee, W.J. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 319, 777–782.

- Savage, D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904.
- Sharon, G., Segal, D., Ringo, J.M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 20051–20056.
- Simon, O. (2005). Micro-organisms as feed additives - probiotics. *Advances in Pork Production*, 161–167.
- Tapon, N., Ito, N., Dickson, B.J., Treisman, J.E., and Hariharan, I.K. (2001). The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* **105**, 345–355.
- Venema, K. (2010). Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 432–438.
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 723–735.

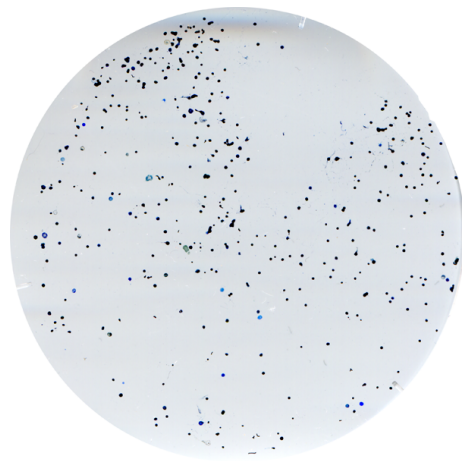
6.3 Dispositif expérimental de l'analyse de la physiologie intestinale



(a) Boîte de petri contenant de la nourriture additionnée de bleu de Bromophénol et un groupe de drosophiles femelles



(b) Exemple de déjections de drosophiles mutantes déposées sur la boîte de pétri durant une période de 60 heures



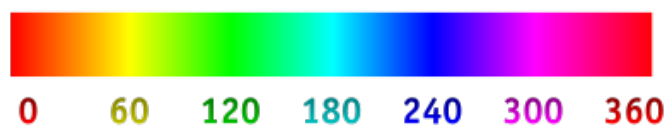
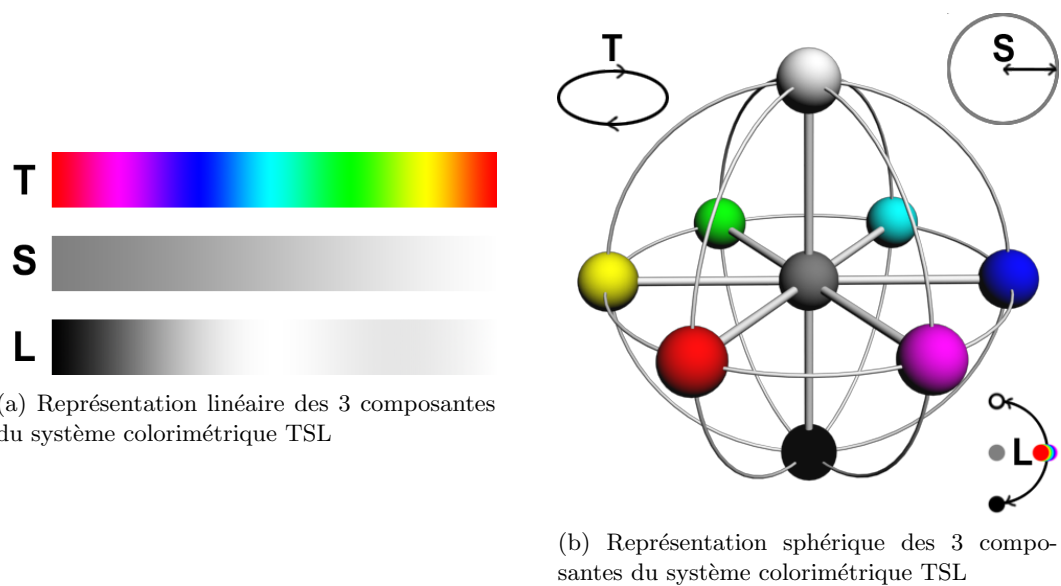
(c) Exemple de déjections de drosophiles sauvages déposées sur la boîte de pétri durant une période de 60 heures

FIGURE 6.2 – Présentation du dispositif expérimental d'analyse de la physiologie intestinale de la drosophile

6.4 Présentation du système colorimétrique TSL

Le système de couleur TSL permet de décomposer les couleurs en leur attribuant trois valeurs : la Teinte, la Saturation et la Luminance (ou intensité lumineuse de la couleur, ou clarté). L'ensemble des valeurs que peut prendre la teinte est contenu entre 0 et 360. La saturation correspond au niveau de gris de la couleur, compris entre 0 (niveau de gris maximal) et 1 (le niveau de gris est nul, la saturation de la couleur est maximale). La luminance indique la luminosité de la couleur, comprise entre 0 (noir) et 1 (blanc) avec 0.5 pour un effet nul de la luminance. Ces graphiques ont été copiés à partir du site Internet Wikipedia.org.

Note : les couleurs que peut prendre le bleu de Bromophénol varient du jaune ($\text{pH} \leq 3.0$) au violet ($\text{pH} \geq 4.5$).



(c) Gamme de valeur possibles de la Teinte

FIGURE 6.3 – Présentation du système colorimétrique TSL

6.5 Impact du genre et du régime alimentaire sur la luminosité des déjections de drosophiles

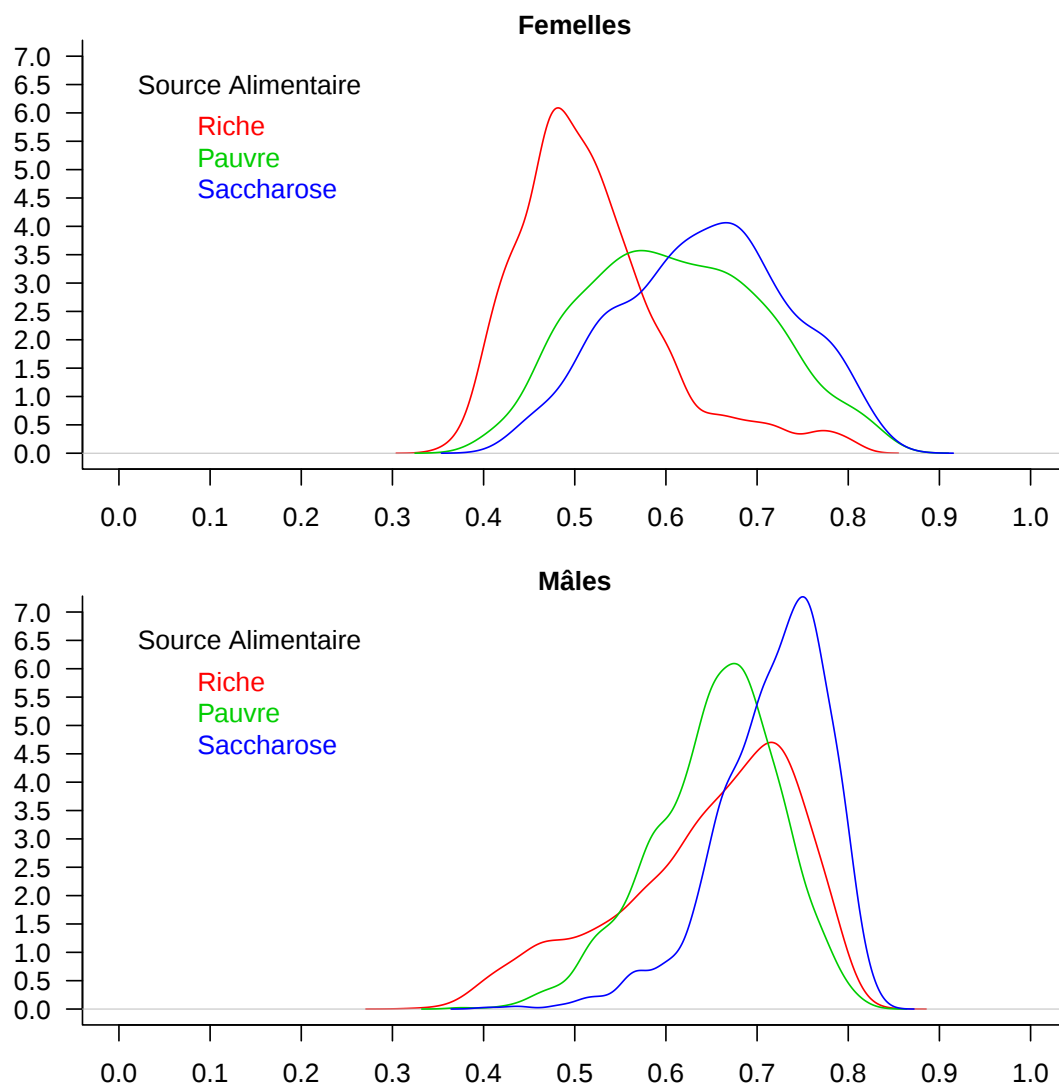
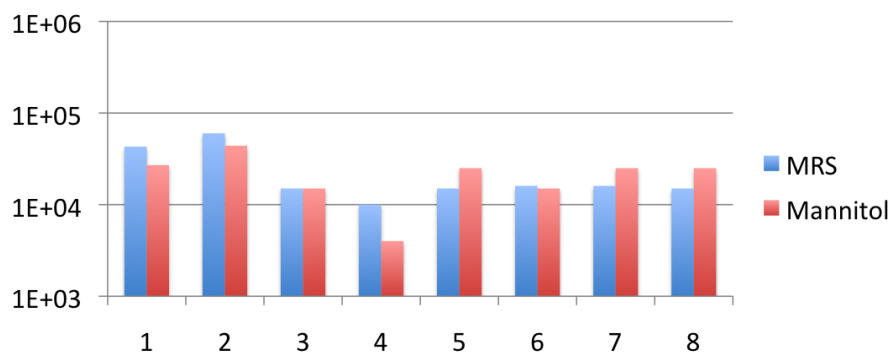


FIGURE 6.4 – Impact du genre et du régime alimentaire sur la distribution des valeurs de luminosité des déjections de drosophiles.

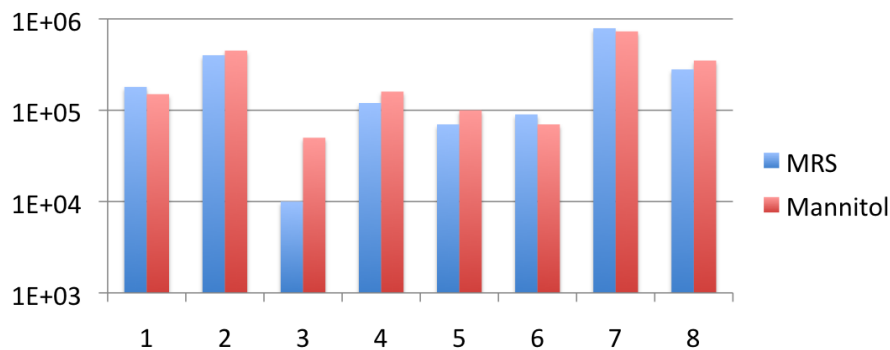
Chaque condition rassemble les données obtenues pour 8 réplicats. Le régime alimentaire "Riche" contient 36g/L d'extraits de levures et 54g/L de saccharose. Le régime alimentaire "Pauvre" contient 6g/L d'extraits de levures et 9g/L de saccharose. Le régime alimentaire "Saccharose" contient 90g/L de saccharose et aucune source de protéines.

6.6 Charges bactériennes des drosophiles en fin d'analyse de la physiologie intestinale en présence ou absence de flore

Les charges bactériennes présentées ici ont été mesurées selon la méthode classique (voir le chapitre Matériels et Méthodes, section 2.5, page 24) à la fin du temps d'incubation des drosophiles dans les boîtes de pétri utilisées pour l'expérience d'analyse de la physiologie intestinale en présence ou absence de flore (voir le chapitre Matériels et Méthodes, section 2.9, page 28 et le chapitre Commensalisme, section 4.5, page 87).



(a) Charge bactérienne chez les sauvages.



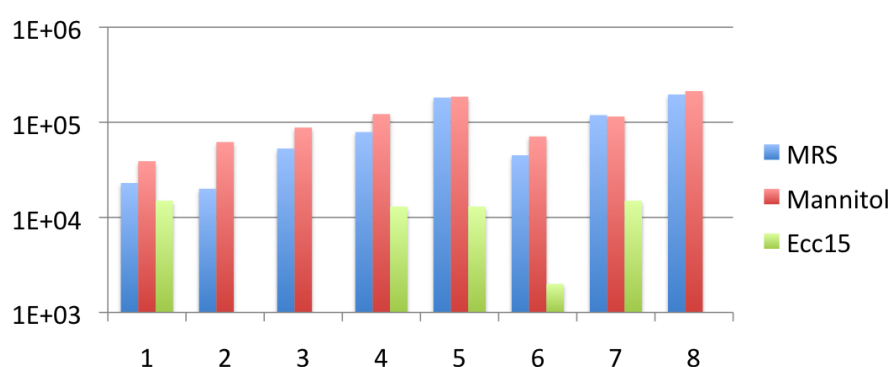
(b) Charge bactérienne chez les mutants.

FIGURE 6.5 – Charges bactériennes des drosophiles à la fin de l'analyse de leur physiologie intestinale en présence ou absence de flore.

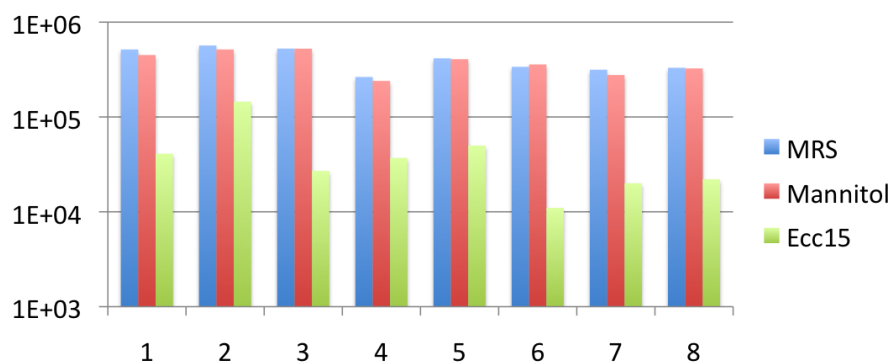
Les charges bactériennes ont été mesurées sur des milieux de culture MRS et Mannitol. Les résultats pour les 8 réplicats de chaque type de drosophiles (sauvage et mutant) sont présentés. Les dilutions 1 :1000 et 1 :10000 des broyats ont été étalées sur les boîtes.

6.7 Charges bactériennes des drosophiles en fin d'analyse de la physiologie intestinale en présence ou absence d'infection bactérienne

Les charges bactériennes présentées ici ont été mesurées selon la méthode classique (voir le chapitre Matériels et Méthodes, section 2.5, page 24) à la fin du temps d'incubation des drosophiles dans les boîtes de pétri utilisées pour l'expérience d'analyse de la physiologie intestinale en présence ou absence d'infection par la bactérie *Erwinia carotovora carotovora* 15 (voir le chapitre Matériels et Méthodes, section 2.9, page 28 et le chapitre Commensalisme, section 4.5, page 87).



(a) Charge bactérienne chez les sauvages.



(b) Charge bactérienne chez les mutants.

FIGURE 6.6 – Charges bactériennes des drosophiles à la fin de l'analyse de leur physiologie intestinale en présence ou absence d'infection.

Les charges bactériennes ont été mesurées sur des milieux de culture MRS, Mannitol et LB additionné de Spectinomycine (la souche *Ecc15* utilisée pour l'infection est résistante à cet antibiotique). Les résultats pour les 8 réplicats de chaque type de drosophiles (sauvage et mutant) sont présentés. Les dilutions 1 :1000 et 1 :10000 des broyats ont été étalées sur les boîtes.

6.8 Analyses statistiques des données de la partie Physiologie Intestinale

Des tests statistiques ont été exécutés sur les données présentées ici pour voir si il y a des différences significatives entre les conditions expérimentales (voir la section 2.9, page 28 du chapitre Matériels et Méthodes). En réalité, le nombre de déjections analysées est tellement grand que tous les résultats des tests pour l'acircularité, la taille, la couleur et la luminance de la couleur sont significatifs, ce qui n'a pas de sens (résultats non montrés). Les seules situations où les tests sont crédibles sont la quantification des déjections dans chaque condition (8 mesures par condition) et le test CAFE. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé, et les résultats sont les suivants :

Nombre de déjections dans chaque condition :

Impact de la flore :

sauvages axéniques / recolonisés : $p=0.8334$

mutants axéniques / recolonisés : $p=0.4005$

sauvages / mutants axéniques : $p=0.01041$

sauvages / mutants recolonisés : $p=0.02385$

Impact de l'infection :

sauvages non infectés / infectés : $p=0.528$

mutants non infectés / infectés : $p=0.06496$

sauvages / mutants non infectés : $p=0.0001554$

sauvages / mutants infectés : $p=0.007362$

Capacité de contenance de nourriture :

sauvages axéniques / recolonisés : $p=0.1049$

mutants axéniques / recolonisés : $p=0.3282$

sauvages / mutants axéniques : $p=0.8335$

sauvages / mutants recolonisés : $p=0.02813$

Pour les résultats du test CAFE, la comparaison de l'ensemble des valeurs obtenues durant les jours 1 à 3 entre sauvages et mutants donne une valeur de $p=0.03773$.

Ces analyses statistiques confirment qu'il y a une différence entre les drosophiles mutantes et sauvages en terme de nombre de déjections, de consommation de nourriture et de capacité de contenance de nourriture en présence d'une flore commensale.

6.9 Informations relatives à la section 4.6 du chapitre Com- mensalisme

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
1	Jon66Cii	4.79	5.98	1.84		2.97	3.21										
2	Jon66Ci	4.75	4.63				2.20										
3	CG18180	2.83	3.77														
4	PGRP-SC1	2.62	5.20			1.58	1.95										
5	CheA87a	2.54															
6	CG10476	2.22			2.29	3.12			4.24								
7	CG18179	2.16	2.30			2.04	1.95										
8	Jon65Ai	2.15	2.59														
9	CG3819	2.12											1.77				
10	Oamb	1.76										1.50					
11	CG10476	1.75			1.77	2.72			3.83								
12	Try29F	1.73				3.46	2.05	1.96	3.31								
13	CG13091	1.72	1.65														
14	Jon99Ci	1.59	2.30										1.50				
15	PGRP-SC2	1.58	1.97														
16	CG6839	1.58															
17	CrebB-17A	1.57															
18	Lsp1alpha	1.57															
19	CG12057		3.54														
20	CG12374		3.05										2.48				
21	CG9463		3.05														
22	CG10592		2.77														
23	CG5150		2.73										1.55				
24	CG14499-RA		2.70	1.72													
25	CG16775		2.62	2.42		2.13	1.52		2.00								
26	CG5246		2.53	1.84									1.67				
27	pirk		2.50				3.45					2.25	5.26			13.14	39.95
28	AttD		2.45	8.26	5.52	3.65	3.25	16.69	18.72								
29	Jon25Bii		2.44										1.87				
30	Maltase A7		2.42			2.15											
31	CG3868		2.42														
32	CG6296		2.40										1.91				
33	CG9466		2.36														
34	CG15534		2.35	1.73													
35	Amy-d		2.34										1.65				
36	LvpL		2.34														
37	CG15533		2.28			1.64											
38	CG31813		2.19														
39	Npc2d		2.19	2.03													
40	CG5107		2.14														
41	Maltase A8		2.14			1.77											
42	CG7025		2.14	1.73									1.87				
43	Maltase A4		2.10			1.92											
44	Jon74E		2.08														
45	CG14219		2.06	2.45		2.15	1.83	2.06	2.42								

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
46	CG5932		2.06														
47	CG3739		2.03														
48	CG17147		1.94										1.97			1.75	
49	CG30360		1.94														
50	CG30160		1.92														
51	CG31704		1.90	1.65		1.95	1.94		1.55								
52	CG8773		1.90	1.52									1.87				
53	lectin-24A		1.90														
54	Jon65Aii		1.89										1.67				
55	CG31343		1.89	1.69									1.92				
56	CG8093		1.89														
57	CG8997		1.89	1.63													
58	CG7542		1.88														
59	MtnB		1.88	1.69													
60	CG16965		1.84			1.86	1.94										
61	Bace		1.84														
62	Jon44E		1.84	1.57													
63	CG11911		1.83										1.97				
64	MtnC		1.81										1.55				
65	CG14500		1.81														
66	CG31463		1.80										2.39			1.55	
67	CG10477		1.79														
68	CG31041		1.78						1.71								
69	Cyp6a21		1.76						1.73								
70	CG13813		1.75														
71	CG7631		1.74										1.92			1.57	
72	Cyp6a17		1.72	3.04	2.32			2.92	4.59								
73	CG4563		1.72			2.56	1.51		1.72								
74	CG18585		1.72	1.73													
75	Ugt86Dc		1.71														
76	CG30047		1.70										1.63				
77	lectin-37Db		1.70														
78	Jon65Aiv		1.67														
79	CG2772		1.66	1.57													
80	CG13492		1.65										1.76				
81	CG3734		1.64										1.60				
82	CG31104		1.64														
83	PGRP-LB		1.64	1.89	1.59	2.39	1.64	1.72	2.50								
84	Muc68E		1.63										1.61				
85	CG3841		1.62										1.55				
86	CG5550		1.61	2.68	1.62	1.97		2.26	3.65								
87	CG8774		1.61										1.80				
88	CG31265		1.61	1.64													
89	CG4653		1.60														
90	CG10827		1.59	1.62													
91	CG34026		1.59														

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
92	CG16749		1.58										1.59				
93	CG15170		1.58														
94	CG30272		1.58										1.79				
95	Jon99Fi		1.58														
96	CG8628		1.58														
97	zetaTry		1.57														
98	CG31758-RA		1.55														
99	MtnD		1.55	1.56													
100	CG14120		1.55										1.79				
101	CG31269		1.55	1.52													
102	CG10062		1.55														
103	CG3106		1.54														
104	CG30043		1.54										1.57				
105	Cyp6d5		1.53														
106	Mdr50		1.52										1.61				
107	CG4053		1.51														
108	CG42249		1.50														
109	CG15661			4.17	3.78			7.32	6.90								
110	SD27140			3.87	2.90			1.71	1.90								
111	GM130			3.66	3.44			2.80	2.42								
112	CG4302			2.60	1.88			13.92	12.52								
113	Cyp12d1-d			2.55				1.84									
114	ChT9			2.52	1.70			2.47	1.63								
115	HDC11981			2.44	2.34												
116	CG15571			2.27													
117	CG12716			2.03													
118	Cyp12d1-d			2.02				1.78									
119	CG14205			2.01													
120	sala			2.01													
121	CG13113			1.92													
122	CT34147			1.78													
123	ft			1.78													
124	CG16898			1.78													
125	CG4066			1.73													
126	Edin			1.72				3.66	5.14								
127	Xbp1			1.67													
128	Ama			1.67													
129	CG11474			1.66	1.91			1.56	1.52								
130	Fkbp13			1.64													
131	CG8299			1.63													
132	CG7916			1.58													
133	CG6640			1.57													
134	Tom			1.56													
135	iotaTry			1.56													
136	CG10051			1.55													
137	Traf4			1.54													

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
138	sktI			1.52	1.69			1.56	1.53								
139	S.CX000659			1.51					2.69								
140	Brd			1.50													
141	Lsp1beta				2.50												
142	LBR				2.00												
143	CG17658				1.81												
144	CG11788				1.79			1.76									
145	retinin				1.79												
146	l(2)03659				1.76												
147	TotX				1.73												
148	TotA				1.69												
149	CG11475				1.61												
150	CG8964				1.56												
151	phr				1.56												
152	CG4962				1.55												
153	CG2812				1.54												
154	mbl				1.51												
155	CG5770				1.50		1.73		2.41								
156	CG31091						7.03		3.01								
157	Def						5.40		7.23								
158	CG31089						4.87									2.47	
159	Amyrel						3.55										
160	CG11192						2.89		1.65	3.33							
161	bt						2.58									2.35	
162	Tsf1						2.50		3.53								
163	sls						2.49									1.96	
164	CG4267						2.47		3.41								
165	CG9682						2.37		2.01							1.81	
166	sls						2.36									2.00	
167	CG42335						2.34										
168	Transposon.27						2.31		2.95								
169	DptB						2.30		10.55	30.39							
170	CG7402						2.27		1.97								
171	PGRP-SD						2.23		4.43	6.73							
172	mwh						2.21	2.94									
173	CG16995						2.19		2.30								
174	CG15829						2.14										
175	CG33346						2.10	1.73									
176	stumps						2.07									1.85	
177	CG31741						1.99										
178	l(2)01289						1.92									1.73	
179	Pif1B						1.90			1.67							
180	CG13077						1.90		2.50								
181	CG42335						1.88										
182	wgn						1.87									1.71	
183	sls						1.86									2.12	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
184	Mhc					1.85										1.75	
185	CT33405					1.85											
186	Arc1					1.85											
187	CG30263					1.84		1.91	3.66								
188	CG32634-RA					1.81										1.62	
189	Tsf1					1.81			2.18								
190	Mbs					1.80										1.72	
191	Hrb98DE					1.78											
192	Prm					1.77										2.29	
193	PNUTS					1.76											
194	CG7180					1.75										1.59	
195	CG17136-RD					1.75										1.77	
196	Rya-r44F					1.74											
197	Mf					1.72										1.71	
198	PGRP-LF					1.72			2.21								
199	AR-2					1.72										1.55	
200	Cbp53E					1.71											
201	CG1681					1.71											
202	tey					1.69											
203	CG32155					1.69											
204	PGRP-LC					1.65			1.67								
205	CG17549					1.65										1.52	
206	CG17190					1.64											
207	pyd					1.63											
208	CG5174					1.63											
209	abba					1.63											
210	Spn4					1.61											
211	Transposon.40					1.61											
212	CG5767					1.60											
213	burs					1.60											
214	NC2alpha					1.60			2.21								
215	CG16997					1.59											
216	Atg7					1.59			1.58								
217	CG3191					1.59										1.67	
218	dpp					1.58										1.84	
219	CG34198					1.57			1.61								
220	CG32477-RA					1.56											
221	Prm					1.56										1.50	
222	CG1674					1.54											
223	CG6232					1.54											
224	CG6845					1.53											
225	CG9465					1.53											
226	CG6667-RC					1.51											
227	Spn4					1.51											
228	CG14744						2.48										
229	CG14456						2.00	1.99									

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits						Réprimés							
		Mouches				Intestins		Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
230	CG10469						1.96				2.17				
231	CG18190						1.93								
232	Muc55B						1.85								
233	CG13335						1.75			1.99	1.64				
234	Klp61F						1.69								
235	CG1602						1.57								
236	CG15072						1.57								
237	CG17047						1.56								
238	CG4789						1.55								
239	CG15414						1.50								
240	CG9826						1.50								
241	Cp15													12.14	
242	CG32594													2.40	
243	CG13905														
244	CG31686														
245	Cp18														
246	CG10154														
247	Ugt37a1														
248	Cp16														
249	CG18258														
250	CG33468														
251	CT34146														
252	CG13323														
253	CG13946														
254	GstD8													1.98	
255	CG3394														
256	CG13325														
257	CG11141														
258	CG30090														
259	wbl														
260	T3dh														
261	Cp19														
262	Femcoat														
263	CG2893														
264	IM18														
265	CG10910														
266	S.C3L001530														
267	CG7443														
268	TotM														
269	Drs														
270	CG9812														
271	CG32277														
272	CG9897														
273	CG31681														
274	CG17239														
275	HDC08273														

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
276	CG32834								2.36								
277	CG14606								2.15								
278	IM2								2.01								
279	IM3								1.99								
280	CG30008								1.97								
281	CG15673								1.94								
282	CG14204								1.86								
283	CG11275								1.83								
284	CG10570								1.77								
285	Cyp4g1								1.74								
286	CG18125								1.73								
287	CG6910								1.71								
288	CG30154								1.68								
289	unk								1.67						1.69		
290	CG13565								1.66						1.74		
291	IM4								1.66								
292	CG18107								1.60								
293	puc								1.59								
294	HDC06105								1.59								
295	Fbp1								1.59								
296	CG13482								1.59								
297	Pde8								1.58								
298	chrw								1.58								
299	Cyt-b5-r								1.55								
300	Rel								1.54								
301	JhI-26								1.54								
302	Kaz1-ORFA&B								1.51								
303	CG30283-RA								1.51								
304	CG15044								1.51								
305	CG13947									2.77			1.81	3.60			
306	GstD5									2.19							
307	CG11912									2.17							
308	Hsp23									1.89							
309	CG13422									1.86							
310	CG8343									1.75							
311	CG3088									1.67							
312	CG10077									1.67							
313	CG4830									1.62			1.69				
314	CG32107									1.60							
315	Pbprp5									1.59							
316	CG6704									1.57							
317	lectin-28C									1.54							
318	Obp19a									1.54							
319	Os-C									1.52							
320	CG9989									1.52							
321	CG13636									1.50							

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
322	CG16778											1.83	2.11				
323	Drep-1											1.76					
324	CG11170											1.69	1.56			1.70	2.11
325	Obp56a											1.65					
326	hts											1.61	1.71		1.56	2.45	1.64
327	Glycogenin											1.58	1.75				
328	CG42365											1.56				3.60	3.99
329	CG15067												2.24				
330	CG6295												2.10				
331	CG17192												2.06	1.62			
332	CG10096												2.01				
333	LvpD												1.87				
334	CG14125												1.86				
335	Rh5												1.82				
336	LysP												1.81				
337	Prx2540-2												1.81				
338	Cyp6a23												1.78				
339	CG11044												1.78				
340	CG17633												1.72				
341	CG31259												1.70				
342	S.C2R002789												1.67			1.76	
343	CG1809												1.66				
344	CG33109												1.66				
345	Obp57b												1.65				
346	CG13658												1.61				
347	CG6337												1.60				
348	CG9945												1.59			1.98	2.29
349	Uro												1.58				
350	inaD												1.57				
351	CG17475												1.56				
352	CG15254												1.53				
353	CG7203												1.53				
354	CG31266												1.53				
355	CG16836												1.52				
356	CG8952												1.51				
357	CG15658												1.51				
358	CG34424												1.51				
359	Cyp12a5												1.50				
360	CG10513												1.50				
361	CG32284												1.50				
362	CG42235												1.50				
363	His2A													1.92			
364	rpr													1.86			
365	CG17949													1.75			
366	GM07660														2.97		
367	CG9940															2.75	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec	Flore Mut	Sauv	Génotype Ax	Rec
368	CG17510														2.30		
369	Trc8														2.30		
370	pAbp														2.23		
371	CG31530														2.21	2.09	
372	CG17159														2.20		
373	Pka-R1														2.12		
374	CG13868														2.04	2.37	
375	Hf														2.01		
376	path														2.00		
377	Eip63F-1														1.96		
378	cenG1A														1.93		
379	LpR2														1.88	1.57	
380	CG30035														1.87		
381	net														1.85		
382	Nedd4														1.85		
383	Arf51F														1.84		
384	Eip75B														1.81		
385	Tsp39D														1.78		
386	CG30372-RA														1.78		
387	CG10277														1.78		
388	CG32782-RB														1.77		
389	GM03914														1.77		
390	ewg														1.76		
391	Mkrn1														1.74		
392	CG31236-RB														1.73		
393	ben														1.72		
394	sba														1.71		
395	bru-2														1.71		
396	CG42258														1.70		
397	CG14375														1.70		
398	Mmp1														1.70		
399	Eip93F														1.69		
400	Btk29A														1.68		
401	trbd														1.66		
402	CG6403														1.65		
403	shep														1.65		
404	Ald														1.65		
405	14-3-3zeta														1.65		
406	CG10777														1.63		
407	l(3)82Fd														1.63		
408	foxo														1.63		
409	desat1														1.62		
410	HDC20349														1.61		
411	Pten														1.61		
412	CG13784														1.60		
413	CG6448														1.59		

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore Mut	Flore Sauv	Génotype Ax	Génotype Rec	Flore Mut	Flore Sauv	Génotype Ax	Génotype Rec	Flore Mut	Flore Sauv	Génotype Ax	Génotype Rec	Flore Mut	Flore Sauv	Génotype Ax	Génotype Rec
414	CG2941														1.59		
415	neur														1.59		
416	sima														1.59		
417	CG1553														1.59		
418	plexA														1.57		
419	LP09564														1.57		
420	CG7097														1.57		
421	Akt1														1.57		
422	CG9007														1.57		
423	CG5073														1.56		
424	Aps														1.56		
425	Dp1														1.56		
426	drl														1.55	1.55	
427	CG13907														1.55		
428	CG40351														1.55		
429	lola														1.54		
430	CG8536														1.54		
431	yuri														1.54		
432	mys														1.53		
433	kis														1.53		
434	Fim														1.52		
435	Fmr1														1.52		
436	S6k														1.52		
437	jim														1.52		
438	cib														1.51		
439	Myo95E														1.51		
440	lab														1.51		
441	Rtnl1														1.50		
442	inx2														1.50		
443	CG17024															2.18	3.01
444	CG10505															2.08	2.34
445	CG8399															1.51	1.61
446	ninaD															2.52	
447	ana															2.07	
448	CG8026															1.99	
449	tim															1.97	
450	Transposon.39															1.94	
451	CG10830															1.86	
452	Glycogenin															1.84	
453	Shaw															1.84	
454	CG15819-RA															1.83	
455	gol															1.83	
456	if															1.81	
457	CG8485															1.81	
458	CG9297															1.79	
459	CG7990															1.77	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore	Génotype			Flore	Génotype			Flore	Génotype			Flore	Génotype		
		Mut	Sauv	Ax	Rec	Mut	Sauv	Ax	Rec	Mut	Sauv	Ax	Rec	Mut	Sauv	Ax	Rec
460	vri																1.77
461	norpA																1.76
462	lola																1.75
463	CG17922																1.73
464	htl																1.72
465	wb																1.70
466	CG9384																1.70
467	Act87E																1.69
468	gpp																1.68
469	CG6043																1.66
470	BG642312																1.66
471	CG31607																1.66
472	Sema-1b																1.66
473	CRMP																1.65
474	nahoda																1.65
475	Transposon.39																1.64
476	CG4752																1.63
477	dsx																1.63
478	Transposon.59																1.63
479	Eip74EF																1.62
480	CG7000-RA																1.61
481	CG8318-RA																1.60
482	CG10550																1.60
483	CG11883																1.60
484	GM05003																1.60
485	CG18604																1.59
486	CG12054																1.59
487	Vha68-1																1.59
488	chif																1.58
489	CG33205																1.58
490	exex																1.56
491	CG33275																1.56
492	CG10163																1.56
493	CG31547																1.56
494	fax																1.55
495	CG10082																1.55
496	GM02743																1.54
497	norpA																1.54
498	CG11299																1.53
499	nuf																1.53
500	Mlc2																1.53
501	CG30445-RA																1.52
502	Tango11																1.52
503	CG11158																1.52
504	CG9993																1.51
505	Tm2																1.50

Continue sur la page suivante

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur (suite)

N°	Gène	Induits								Réprimés							
		Mouches				Intestins				Mouches				Intestins			
		Flore	Génotype	Flore	Génotype	Flore	Génotype	Flore	Génotype	Flore	Génotype	Flore	Génotype	Flore	Génotype	Flore	Génotype
		Mut	Sauv	Ax	Rec	Mut	Sauv	Ax	Rec	Mut	Sauv	Ax	Rec	Mut	Sauv	Ax	Rec
506	CG5177															1.50	
507	CG8012															1.50	
508	Ac76E															1.50	
509	CG6034																2.43
510	vanin-like																1.77
511	CG33173																1.76
512	Acox57D-d																1.74
513	CG33966																1.73
514	CG13806																1.69
515	CG7582																1.64
516	CG13810																1.63
517	CG32302																1.63
518	CG34452																1.63
519	CG31636																1.61
520	CG3759																1.59
521	Sans																1.58
522	CG30282-RA																1.54
523	CG3301																1.53

TABLE 6.1 – Liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur.

Les valeurs contenues dans le tableau indiquent le taux de changement d'expression lorsqu'on fait varier un facteur (Flore ou Génotype) en ayant fixé l'autre facteur. Par exemple, la première colonne indique les taux de variation entre individus Axénique et individus Recolonisés (facteur Flore) chez les Mutants, et la deuxième colonne rapporte ces mêmes taux chez les Sauvages. Ensuite, la troisième colonne indique les taux de variation entre individus Sauvages et individus Mutants (facteur Génotype) chez les Axéniques, et la quatrième colonne rapporte ces mêmes taux chez les Recolonisés. Pour les 4 premières colonnes, les informations sont données pour ce qui concerne la mouche entière. Les 4 colonnes qui suivent donnent les mêmes informations pour l'intestin. Les gènes dont la variation du facteur considéré provoque l'induction de leur expression sont séparés de ceux dont la variation du facteur considéré provoque la répression de leur expression.

La variation du facteur Flore est le passage de Axénique à Recolonisés, et celle du facteur génotype est le passage de Sauvage à Mutant. Par exemple, le gène Jon66cii (n°1) est induit chez les individus Recolonisés par rapport aux Axéniques d'un facteur 4.79 chez les mutants, en mouches entières ; et le gène CG3819 (n°9) est réprimé d'un facteur 1.77 chez les individus Mutants par rapport aux Sauvages, chez les Recolonisés, en mouches entières.

TABLE 6.2 – Correspondance Nom - Numéro dans la liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur.

Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°
Nom	No	Nom	No	Nom	No	Nom	No	Nom	No	Nom	No	Nom	No
14-3-3zeta	405	CG13636	321	CG2941	414	CG42335	181	CheA87a	5	iotaTry	135	PGRP-SC2	15
abba	209	CG13658	346	CG30008	280	CG42365	328	chif	488	JhI-26	301	PGRP-SD	171
Ac76E	508	CG13784	412	CG30035	380	CG4267	164	chrw	298	jim	437	phr	151
Acox57D-d	512	CG13806	514	CG30043	104	CG4302	112	Cht9	114	Jon25Bii	29	Pif1B	179
Act87E	467	CG13810	516	CG30047	76	CG4563	73	cib	438	Jon44E	62	pirk	27
Akt1	421	CG13813	70	CG30090	258	CG4653	89	Cp15	241	Jon65Ai	8	Pka-R1	373
Ald	404	CG13868	374	CG30154	288	CG4752	476	Cp16	248	Jon65Aii	54	plexA	418
Ama	128	CG13905	243	CG30160	50	CG4789	238	Cp18	245	Jon65Aiv	78	PNUTS	193
Amy-d	35	CG13907	427	CG30263	187	CG4830	313	Cp19	261	Jon66Ci	2	Prm	192
Amyrel	159	CG13946	253	CG30272	94	CG4962	152	CrebB-17A	17	Jon66Cii	1	Prm	221
ana	447	CG13947	305	CG30282-RA	522	CG5073	423	CRMP	473	Jon74E	44	Prx2540-2	337
Aps	424	CG14120	100	CG30283-RA	303	CG5107	40	CT33405	185	Jon99Ci	14	Pten	411
AR-2	199	CG14125	334	CG30360	49	CG5150	23	CT34146	251	Jon99Fi	95	puc	293
Arc1	186	CG14204	282	CG30372-RA	386	CG5174	208	CT34147	122	Kaz1	302	pyd	207
Arf51F	383	CG14205	119	CG30445-RA	501	CG5177	506	Cyp12a5	359	kis	433	Rel	300
Atg7	216	CG14219	45	CG3088	311	CG5246	26	Cyp12d1-d	113	Klp61F	234	retinin	145
AttD	28	CG14375	397	CG31041	68	CG5550	86	Cyp12d1-d	118	l(2)01289	178	Rh5	335
Bace	61	CG14456	229	CG3106	103	CG5767	212	Cyp4g1	285	l(2)03659	146	rpr	364
ben	393	CG14499-RA	24	CG31089	158	CG5770	155	Cyp6a17	72	l(3)82Fd	407	Rtnl1	441
BG642312	470	CG14500	65	CG31091	156	CG5932	46	Cyp6a21	69	lab	440	Rya-r44F	196
Brd	140	CG14606	277	CG31104	82	CG6034	509	Cyp6a23	338	LBR	142	S.C2R002789	342
bru-2	395	CG14744	228	CG31236-RB	392	CG6043	469	Cyp6d5	105	lectin-24A	53	S.C3L001530	266
bt	161	CG15044	304	CG31259	341	CG6232	223	Cyt-b5-r	299	lectin-28C	317	S.CX000659	139
Btk29A	400	CG15067	329	CG31265	88	CG6295	330	Def	157	lectin-37Db	77	S6k	436
burs	213	CG15072	236	CG31266	354	CG6296	32	desat1	409	lola	429	sala	120
Cbp53E	200	CG15170	93	CG31269	101	CG6337	347	Dp1	425	lola	462	Sans	521
cenG1A	378	CG15254	352	CG31343	55	CG6403	402	dpp	218	LP09564	419	sba	394
CG10051	136	CG15414	239	CG31463	66	CG6448	413	DptB	169	LpR2	379	SD27140	110
CG10062	102	CG1553	417	CG31530	371	CG6640	133	Drep-1	323	Lsp1alpha	18	Sema-1b	472
CG10077	312	CG15533	37	CG31547	493	CG6667-RC	226	drl	426	Lsp1beta	141	Shaw	453
CG10082	495	CG15534	34	CG31607	471	CG6704	316	Drs	269	LvpD	333	shep	403
CG10096	332	CG15571	116	CG31636	519	CG6839	16	dsx	477	LvpL	36	sima	416
CG10154	246	CG15658	357	CG31681	273	CG6845	224	edin	126	LysP	336	sktl	138
CG10163	492	CG15661	109	CG31686	244	CG6910	287	Eip63F-1	377	Maltase A4	43	sls	163
CG10277	387	CG15673	281	CG31704	51	CG7000-RA	480	Eip74EF	479	Maltase A7	30	sls	166
CG10469	230	CG15819-RA	454	CG31741	177	CG7025	42	Eip75B	384	Maltase A8	41	sls	183
CG10476	6	CG15829	174	CG31758-RA	98	CG7097	420	Eip93F	399	mb1	154	Spn4	210
CG10476	11	CG1602	235	CG31813	38	CG7180	194	ewg	390	Mbs	190	Spn4	227
CG10477	67	CG1674	222	CG3191	217	CG7203	353	exex	490	Mdr50	106	stumps	176

Continue sur la page suivante

TABLE 6.2 – suite de la page précédente

Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°	Nom	N°
CG10505	444	CG16749	92	CG32107	314	CG7402	170	fax	494	Mf	197	T3dh	260
CG10513	360	CG16775	25	CG32155	203	CG7443	267	Fbp1	295	Mhc	184	Tango11	502
CG10550	482	CG16778	322	CG32277	271	CG7542	58	Femcoat	262	Mkrn1	391	tey	202
CG10570	284	CG1681	201	CG32284	361	CG7582	515	Fim	434	Mlc2	500	tim	449
CG10592	22	CG16836	355	CG32302	517	CG7631	71	Fkbp13	130	Mmp1	398	Tm2	505
CG10777	406	CG16898	124	CG32477-RA	220	CG7916	132	Fmr1	435	MtnB	59	Tom	134
CG10827	90	CG16965	60	CG32594	242	CG7990	459	foxo	408	MtnC	64	TotA	148
CG10830	451	CG16995	173	CG32634-RA	188	CG8012	507	ft	123	MtnD	99	TotM	268
CG10910	265	CG16997	215	CG32782-RB	388	CG8026	448	Glycogenin	327	Muc55B	232	TotX	147
CG11044	339	CG17024	443	CG32834	276	CG8093	56	Glycogenin	452	Muc68E	84	Traf4	137
CG11141	257	CG17047	237	CG3301	523	CG8299	131	GM02743	496	mwh	172	Transposon.27	168
CG11158	503	CG17136-RD	195	CG33109	344	CG8318-RA	481	GM03914	389	Myo95E	439	Transposon.39	450
CG11170	324	CG17147	48	CG33173	511	CG8343	310	GM05003	484	mys	432	Transposon.39	475
CG11192	160	CG17159	372	CG33205	489	CG8399	445	GM07660	366	nahoda	474	Transposon.40	211
CG11275	283	CG17190	206	CG33275	491	CG8485	457	GM130	111	NC2alpha	214	Transposon.59	478
CG11299	498	CG17192	331	CG33346	175	CG8536	430	gol	455	Nedd4	382	trbd	401
CG11474	129	CG17239	274	CG33468	250	CG8628	96	gpp	468	net	381	Trc8	369
CG11475	149	CG17475	351	CG3394	255	CG8773	52	GstD5	306	neur	415	Try29F	12
CG11788	144	CG17510	368	CG33966	513	CG8774	87	GstD8	254	ninaD	446	Tsf1	162
CG11883	483	CG17549	205	CG34026	91	CG8952	356	HDC06105	294	norpA	461	Tsf1	189
CG11911	63	CG17633	340	CG34198	219	CG8964	150	HDC08273	275	norpA	497	Tsp39D	385
CG11912	307	CG17658	143	CG34424	358	CG8997	57	HDC11981	115	Npc2d	39	Ugt37a1	247
CG12054	486	CG17922	463	CG34452	518	CG9007	422	HDC20349	410	nuf	499	Ugt86Dc	75
CG12057	19	CG17949	365	CG3734	81	CG9297	458	Hf	375	Oamb	10	unk	289
CG12374	20	CG1809	343	CG3739	47	CG9384	466	His2A	363	Obp19a	318	Uro	349
CG12716	117	CG18107	292	CG3759	520	CG9463	21	Hrb98DE	191	Obp56a	325	vanin-like	510
CG13077	180	CG18125	286	CG3819	9	CG9465	225	Hsp23	308	Obp57b	345	Vha68-1	487
CG13091	13	CG18179	7	CG3841	85	CG9466	33	htl	464	Os-C	319	vri	460
CG13113	121	CG18180	3	CG3868	31	CG9682	165	hts	326	pAbp	370	wb	465
CG13323	252	CG18190	231	CG40351	428	CG9812	270	if	456	path	376	wbl	259
CG13325	256	CG18258	249	CG4053	107	CG9826	240	IM18	264	Pbprp5	315	wgn	182
CG13335	233	CG18585	74	CG4066	125	CG9897	272	IM2	278	Pde8	297	Xbp1	127
CG13422	309	CG18604	485	CG42235	362	CG9940	367	IM3	279	PGRP-LB	83	yuri	431
CG13482	296	CG2772	79	CG42249	108	CG9945	348	IM4	291	PGRP-LC	204	zetaTry	97
CG13492	80	CG2812	153	CG42258	396	CG9989	320	inaD	350	PGRP-LF	198		
CG13565	290	CG2893	263	CG42335	167	CG9993	504	inx2	442	PGRP-SC1	4		

TABLE 6.2 – Correspondance Nom - Numéro dans la liste de tous les gènes dérégulés d'un facteur 1.5 ou supérieur

Note : la suite de la colonne 1 sur la page 1 est la colonne 1 sur la page 2. La suite de la colonne 1 sur la page 2 est la colonne 2 sur la page 1.

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG12057	3.54		unknown	unknown	unknown
CG18180	3.30		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG9463	3.05		ISS : calcium ion transport;	ISS : alpha-mannosidase activity;IEA : zinc ion binding;IEA : carbohydrate binding;	ISS : lysosome;
CG10592	2.77		IEA : metabolic process;	ISS : alkaline phosphatase activity;	ND
CheA87a	2.54		ND	unknown	unknown
CG3868	2.42		unknown	unknown	unknown
Jon65Ai	2.37		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG9466	2.36		IEA : mannose metabolic process;	IEA : carbohydrate binding;ISS : alpha-mannosidase activity;IEA : zinc ion binding;	ISS : lysosome;
LvpL	2.34		NAS : glucose metabolic process;IEA : carbohydrate metabolic process;	IEA : cation binding;ISS : alpha-glucosidase activity;NAS : alpha-glucosidase activity;	ND
CG31813	2.19		ND	ND	ND
CG5107	2.14		unknown	unknown	unknown
Jon74E	2.08		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG5932	2.06		unknown	ISS : triglyceride lipase activity;	ND
CG3739	2.03		IEA : proteolysis;	ISS : serine-type peptidase activity;	ND
CG30360	1.94		IEA : proteolysis;	IEA : cation binding;IEA : catalytic activity;	ND
CG30160	1.92		ND	ND	ISS : integral to membrane;
lectin-24A	1.90		ND	ISS : galactose binding;IEA : binding;	ND
CG8093	1.89		unknown	ISS : triglyceride lipase activity;ISS : lipase activity;	ND
CG7542	1.88		IEA : metabolic process;	ISS : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
Bace	1.84		IEA : proteolysis;	ISS : aspartic-type endopeptidase activity;	ND
CG14500	1.81		ND	IEA : binding;	ND
CG10477	1.79		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : endopeptidase activity;	ND

Continue sur la page suivante

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
PGRP-SC2	1.78		ISS : peptidoglycan catabolic process; ISS : innate immune response; NAS : defense response; ISS : immune response;	IEA : protein binding; ISS : peptidoglycan binding; NAS : peptidoglycan binding; IEA : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity;	ISS : extracellular region; NAS : integral to plasma membrane;
CG13813	1.75		unknown	unknown	unknown
Ugt86Dc	1.71		IEA : metabolic process;	ISS : 2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase activity; ISS : glucuronosyltransferase activity;	ND
lectin-37Db	1.70		ND	ISS : galactose binding; IEA : binding;	ND
CG13091	1.68		IEA : metabolic process;	IEA : binding; IEA : catalytic activity;	ND
Jon65Aiv	1.67		NAS : proteolysis; IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity; ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG31104	1.64		IEA : lipid metabolic process;	unknown	unknown
CG4653	1.60		IEA : metabolic process;	IEA : serine-type endopeptidase activity; NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG34026	1.59		ND	ND	ND
CG15170	1.58		unknown	unknown	unknown
CG6839	1.58		TAS : ectodermal cell fate specification; IDA : regulation of hemocyte proliferation; TAS : anterior/posterior pattern formation; TAS : Toll signaling pathway; TAS : germ cell migration; TAS : negative regulation of transcription, DNA-dependent; TAS : mesodermal cell fate specification; TAS : immune response; TAS : positive regulation of transcription, DNA-dependent; TAS : dorsal/ventral axis specification; TAS : gastrulation involving germ band extension	IEA : metal ion binding; IEA : nucleic acid binding; IEA : hydrolase activity;	ND
Jon99Fi	1.58		IEA : proteolysis; NAS : digestion; NAS : proteolysis;	IEA : serine-type endopeptidase activity; NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG8628	1.58		ND	ISS : acyl-CoA binding; ISS : enzyme inhibitor activity; ISS : diazepam binding;	ND

Continue sur la page suivante

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CrebB-17A	1.57		IEA : multicellular organismal development;NAS : eggshell chorion assembly;	IEA : protein dimerization activity;IMP : RNA polymerase II transcription factor activity;ISS : protein dimerization activity;NAS : RNA polymerase II transcription factor activity;IDA : sequence-specific DNA binding;NAS : DNA binding;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IMP : DNA binding;IEA : oxygen transporter activity;NAS : nutrient reservoir activity;	IMP : nucleus;NAS : nucleus;
Lsp1alpha	1.57		ND		NAS : extracellular region;IDA : lipid particle;ISS : larval serum protein complex;IDA : larval serum protein complex;
zetaTry	1.57		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	ISS : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	NAS : extracellular region;
CG31758-RA	1.55		NAS : defense response;IEA : cell adhesion;	unknown	unknown
CG10062	1.55		IEA : proteolysis;	IEA : peptidase activity;	ND
CG3106	1.54		ND	IEA : transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups;	ND
Cyp6d5	1.53		IEA : oxidation-reduction process;	IEA : electron carrier activity;ISS : electron carrier activity;IEA : heme binding;IEA : monooxygenase activity;NAS : electron carrier activity;	NAS : microsome;NAS : membrane;
CG4053	1.51		IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG42249	1.50		IEA : nucleotide catabolic process;	ISS : 5'-nucleotidase activity;IEA : metal ion binding;IEA : nucleotide binding;	ND
Jon66Ci	4.69	2.20	IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	NAS : endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
PGRP-SC1	3.91	1.76	NAS : innate immune response;NAS : peptidoglycan catabolic process;IEA : peptidoglycan catabolic process;NAS : defense response;	unknown	unknown
Maltase A7	2.42	2.15	IEA : carbohydrate metabolic process;	ISS : alpha-glucosidase activity;IEA : cation binding;	ND
CG15533	2.28	1.64	IEA : sphingomyelin catabolic process;ISS : sphingomyelin metabolic process;	ISS : sphingomyelin phosphodiesterase activity;	ND

Continue sur la page suivante

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG18179	2.23	1.99	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND
Maltase A8	2.14	1.77	IEA : carbohydrate metabolic process;	ISS : alpha-glucosidase activity;IEA : cation binding;	ND
Maltase A4	2.10	1.92	IEA : carbohydrate metabolic process	IEA : cation binding;ISS : alpha-glucosidase activity;	ND
CG16965	1.84	1.90	IEA : carbohydrate metabolic process;	ISS : alpha,alpha-trehalase activity;	ND
Amyrel		3.55	IEA : carbohydrate metabolic process;	IEA : cation binding;NAS : oligo-1,6-glucosidase activity;IEA : catalytic activity;NAS : alpha-amylase activity;	ND
mwh		2.58	IEA : chitin metabolic process;	IEA : Rho GTPase binding;IEA : actin binding;	ND
CG14744		2.48	IEA : transmembrane transport;	ND	IEA : integral to membrane;
CG42335		2.34	IEA : signal transduction;ISS : cyclic nucleotide metabolic process;ISS : regulation of proteolysis;	IEA : zinc ion binding;NAS : aminopeptidase activity;IEA : metallopeptidase activity;	ND
CG15829		2.14	ISS : cellular acyl-CoA homeostasis;	ISS : enzyme inhibitor activity;ISS : acyl-CoA binding;ISS : diazepam binding;	ND
CG31741		1.99	ISS : proteolysis;	NAS : scavenger receptor activity;ISS : scavenger receptor activity;	NAS : integral to plasma membrane;IEA : membrane;
CG18190		1.93	ND	IEA : microtubule binding;	IDA : microtubule associated complex;
CG33346		1.92	ND	IEA : metal ion binding;IEA : nucleic acid binding;IEA : hydrolase activity;	ND
CG42335		1.88	IEA : proteolysis;	IEA : zinc ion binding;NAS : aminopeptidase activity;IEA : metallopeptidase activity;	ND
CT33405		1.85	IDA : learning or memory;TAS : long-term memory;TAS : circadian rhythm;TAS : rhythmic behavior;TAS : regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep;IMP : long-term memory;IDA : long-term memory;NAS : learning or memory;	unknown	unknown
Arc1		1.85	IDA : behavioral response to starvation;	IEA : zinc ion binding;IEA : nucleic acid binding;	ND
Muc55B		1.85	ND	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Hrb98DE		1.78	ND	ISS : mRNA binding;IEA : nucleotide binding;IDA : sequence-specific DNA binding;NAS : mRNA binding;	ISS : ribonucleoprotein complex;IPI : ribonucleoprotein complex;IDA : ribonucleoprotein complex;NAS : ribonucleoprotein complex;IDA : polytene chromosome puff;ISS : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex;
PNUTS		1.76	NAS : regulation of protein dephosphorylation;IMP : phagocytosis, engulfment;ISS : protein targeting;ISS : regulation of protein dephosphorylation;ISS : regulation of catalytic activity;IEA : transcription;	ISS : protein phosphatase regulator activity;IEA : DNA binding;NAS : protein phosphatase regulator activity;IEA : transcription regulator activity;IEA : zinc ion binding;IEA : protein binding;	IEA : nucleus;NAS : nucleus;
Rya-r44F		1.74	IEA : cellular calcium ion homeostasis;TAS : calcium ion transport;IEA : transmembrane transport;IEA : calcium ion transport;IMP : muscle contraction;	TAS : ryanodine-sensitive calcium-release channel activity;IEA : calcium ion binding;ISS : ryanodine-sensitive calcium-release channel activity;NAS : ryanodine-sensitive calcium-release channel activity;	IDA : microtubule associated complex;NAS : integral to membrane;IEA : integral to membrane;NAS : endoplasmic reticulum membrane;
Cbp53E		1.71	ISS : cellular calcium ion homeostasis;	ISS : calcium ion binding;NAS : calcium ion binding;TAS : calcium ion binding;	ND
CG1681tey		1.71 1.69	ND IMP : negative regulation of transcription;IMP : synaptic target recognition;	ISS : glutathione transferase activity; IMP : transcription repressor activity;	ND IDA : nucleus;
CG32155Klp61F		1.69 1.69	IEA : glutamine metabolic process; IMP : border follicle cell migration;IMP : antimicrobial humoral response;IMP : axon guidance;IMP : segment specification;IEA : chromatin assembly or disassembly;IMP : blastoderm segmentation;	ISS : omega peptidase activity; IDA : motor activity;IEA : ATP binding;ISS : plus-end-directed microtubule motor activity;NAS : plus-end-directed microtubule motor activity;ISS : microtubule motor activity;	ND IDA : fusome;IDA : microtubule associated complex;NAS : plus-end kinesin complex;IDA : cytoplasm;IDA : kinesin complex;NAS : spindle;IDA : endoplasmic reticulum;ISS : kinesin complex;IDA : Golgi apparatus;ISS : plus-end kinesin complex;
CG17190		1.64	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
pyd		1.63	NAS : regulation of JNK cascade;IMP : fusion cell fate specification;IMP : cell-cell adhesion;NAS : establishment or maintenance of cell polarity;TAS : dorsal closure;NAS : dorsal closure;NAS : JNK cascade;IMP : branch fusion, open tracheal system;	IEA : protein binding;NAS : guanylate kinase activity;ISS : guanylate kinase activity;	NAS : adherens junction;TAS : adherens junction;IDA : cell-cell adherens junction;
CG5174		1.63	IEA : metabolic process;	IEA : pyridoxal phosphate binding;IEA : catalytic activity;	ND
abba		1.63	ND	IEA : protein binding;IEA : zinc ion binding;	ND
Spn4		1.61	IDA : negative regulation of endopeptidase activity;IMP : negative regulation of protein maturation by peptide bond cleavage;IMP : negative regulation of peptide hormone processing;	NAS : serine-type endopeptidase inhibitor activity;IDA : serine-type endopeptidase inhibitor activity;ISS : serine-type endopeptidase inhibitor activity;	ND
Transposon.40		1.61	unknown	unknown	unknown
CG5767		1.60	ND	unknown	unknown
burs		1.60	IMP : cuticle pigmentation;IMP : regulation of adult chitin-containing cuticle pigmentation;IMP : chitin-based cuticle tanning;NAS : regulation of chitin-based cuticle tanning;IMP : imaginal disc-derived wing morphogenesis;	IMP : hormone activity;NAS : neuropeptide hormone activity;IC : neuropeptide hormone activity;	IDA : extracellular region;IDA : bursicon neuropeptide hormone complex;IDA : terminal button;
CG16997		1.59	IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG1602		1.57	ND	IEA : zinc ion binding;IEA : nucleic acid binding;	IEA : intracellular;
CG15072		1.57	unknown	unknown	unknown
CG32477-RA		1.56	unknown	unknown	unknown
CG17047		1.56	unknown	unknown	unknown
CG4789		1.55	ND	ISS : GTP binding;	ND
CG1674		1.54	unknown	unknown	unknown
CG6232		1.54	unknown	IEA : zinc ion binding;IEA : metalloendopeptidase activity;	IEA : proteinaceous extracellular matrix;
CG6845		1.53	ND	ND	IEA : integral to membrane;
CG9465		1.53	IEA : carbohydrate metabolic process;	IEA : zinc ion binding;IEA : carbohydrate binding;ISS : alpha-mannosidase activity;	ISS : lysosome;
CG6667-RC		1.51	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Spn4		1.51	IDA : negative regulation of endopeptidase activity;IMP : negative regulation of protein maturation by peptide bond cleavage;IMP : negative regulation of peptide hormone processing;	NAS : serine-type endopeptidase inhibitor activity;IDA : serine-type endopeptidase inhibitor activity;ISS : serine-type endopeptidase inhibitor activity;	ND
CG15414		1.50	unknown	unknown	unknown
CG9826		1.50	unknown	ISS : high affinity inorganic phosphate :sodium symporter activity;	ND

TABLE 6.3 – Liste des gènes induits par la présence de la flore

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Flore. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Certains gènes répondent dans la mouche entière et dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
GstD5	2.19		unknown	NAS : glutathione transferase activity;ISS : glutathione transferase activity;	
CG11912	2.17		IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	
Hsp23	1.89		IMP : regulation of alternative nuclear mRNA splicing, via spliceosome;IMP : negative regulation of RNA splicing;	ISS : actin binding;	
CG13422	1.86		ISS : defense response to Gram-negative bacterium;	ND	
CG8343	1.75		IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	ISS : mannose binding;	
CG3088	1.67		IEA : carboxylic acid metabolic process;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	
CG10077	1.67		ND	IEA : nucleic acid binding;IEA : ATP-dependent helicase activity;ISS : RNA helicase activity;IEA : ATP binding;	
CG32107	1.60		ND	ND	
Pbprp5	1.59		ISS : amino acid transmembrane transport;IMP : growth;NAS : regulation of growth;	IEA : odorant binding;NAS : phenylalkylamine binding;NAS : pheromone binding;ISS : pheromone binding;ISA : odorant binding;	
CG6704	1.57		unknown	ISS : retinol dehydratase activity;ISS : sulfotransferase activity;	
lectin-28C	1.54		ND	IEA : binding;ISS : galactose binding;	
Obp19a	1.54		IDA : elevation of cytosolic calcium ion concentration involved in G-protein signaling coupled to IP3 second messenger;ISS : octopamine or tyramine signaling pathway;IDA : G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger;IMP : ovulation;	NAS : odorant binding;ISA : odorant binding;ISS : odorant binding;	
Os-C	1.52		IEA : transport;ISS : sensory perception of chemical stimulus;ISA : sensory perception of chemical stimulus;	NAS : pheromone binding;	
CG9989	1.52		IEA : NAD biosynthetic process;ISS : NAD biosynthetic process;	IEA : hydrolase activity;IEA : nucleic acid binding;IEA : metal ion binding;	
CG13636	1.50		unknown	unknown	
His2A		1.92	unknown	unknown	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
rpr		1.86	IGI : induction of apoptosis;TAS : protein ubiquitination;IGI : salivary gland cell autophagic cell death;TAS : programmed cell death;TAS : regulation of proteolysis;TAS : negative regulation of translation;TAS : induction of apoptosis by ionic changes;TAS : response to DNA damage stimulus;TAS : induction of apoptosis;TAS : nurse cell apoptosis;IDA : regulation of protein catabolic process;TAS : larval central nervous system remodeling;IGI : larval midgut cell programmed cell death;TAS : apoptosis;TAS : embryonic development via the syncytial blastoderm;IGI : apoptosis;	IDA : phospholipid binding ;	
CG17949		1.75	unknown	ND	
GM07660		2.97	unknown	unknown	
CG9940		2.75	IEA : transmembrane transport ;	IEA : hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds;IEA : ATP binding;ISS : NAD+ synthase (glutamine-hydrolyzing) activity;IEA : NAD+ synthase (glutamine-hydrolyzing) activity ;	
CG17510		2.30	IGI : mitochondrion organization ;	IEA : binding ;	
Trc8		2.30	IMP : ventral midline development ;IMP : negative regulation of growth ;	IPI : protein binding ;IEA : zinc ion binding ;	
pAbp		2.23	ND	unknown	
CG17159		2.20	ND	ND	
Pka-R1		2.12	IMP : olfactory learning;IMP : actin filament organization;IDA : response to ethanol;IEA : signal transduction;IEA : regulation of protein phosphorylation;NAS : olfactory learning;IMP : neuromuscular synaptic transmission;IMP : oocyte microtubule cytoskeleton polarization;NAS : cAMP-mediated signaling;IMP : molting cycle, chitin-based cuticle ;	NAS : cAMP-dependent protein kinase regulator activity;NAS : cyclic nucleotide binding;IMP : cAMP-dependent protein kinase regulator activity;ISS : cAMP-dependent protein kinase regulator activity ;	
Hf		2.01	IEP : innate immune response ;	ND	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
path		2.00	unknown	NAS : amino acid transmembrane transporter activity;ISS : amino acid transmembrane transporter activity;	
Eip63F-1		1.96	TAS : defense response to fungus;TAS : defense response to Gram-negative bacterium;NAS : defense response to fungus;IEP : antifungal humoral response;TAS : antifungal humoral response;ISS : defense response to fungus;NAS : innate immune response;IDA : defense response to fungus;NAS : antifungal humoral response;IDA : defense response;TAS : antibacterial humoral response;	IDA : calcium ion binding;NAS : calcium ion binding;	
cenG1A		1.93	NAS : small GTPase mediated signal transduction;IEA : regulation of ARF GTPase activity;	NAS : ARF GTPase activator activity;ISS : ARF GTPase activator activity;IEA : GTP binding;IEA : zinc ion binding;	
CG30035		1.87	ND	ISS : glucose transmembrane transporter activity;	
net		1.85	IMP : axon guidance;IPI : receptor internalization;IMP : protein ubiquitination;IMP : positive regulation of receptor internalization;IMP : negative regulation of Notch signaling pathway;IGI : negative regulation of Notch signaling pathway;IMP : positive regulation of endocytosis;IMP : receptor internalization;IMP : axon midline choice point recognition;IMP : axon midline choice point recognition;IDA : protein ubiquitination;IMP : positive regulation of synaptogenesis;	NAS : RNA polymerase II transcription factor activity;ISS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;	
Nedd4		1.85	NAS : negative regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly;	IPI : Notch binding;IPI : protein binding;IDA : protein domain specific binding;IPI : protein domain specific binding;ISS : ubiquitin-protein ligase activity;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Arf51F		1.84	TAS : synaptic vesicle endocytosis;IMP : myoblast fusion;TAS : endosome transport;IDA : protein ADP-ribosylation;NAS : protein transport;IMP : spermatogenesis;NAS : neurotransmitter secretion;ISS : protein ADP-ribosylation;NAS : protein ADP-ribosylation;IMP : male meiosis cytokinesis;IEA : small GTPase mediated signal transduction ;	NAS : GTP binding;ISS : GTP binding;NAS : GTPase activity;IDA : NAD(P)+-protein-arginine ADP-ribosyltransferase activity;ISS : GTPase activity;	
Eip75B		1.81	IEA : regulation of transcription, DNA-dependent;IMP : antimicrobial humoral response;NAS : molting cycle, chitin-based cuticle;IMP : regulation of ecdysteroid metabolic process;NAS : ecdysone-mediated induction of salivary gland cell autophagic cell death;NAS : oogenesis;IMP : ecdysis, chitin-based cuticle;IMP : molting cycle, chitin-based cuticle;NAS : regulation of transcription, DNA-dependent ;	ISS : ligand-dependent nuclear receptor activity;IDA : heme binding;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IEA : steroid hormone receptor activity;IEA : zinc ion binding;IEA : sequence-specific DNA binding;NAS : ligand-dependent nuclear receptor activity;ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity ;	
Tsp39D		1.78	ND	ND	
CG30372-RA		1.78	IEA : carbohydrate metabolic process ;	unknown	
CG10277		1.78	ND	IEA : protein binding;IEA : zinc ion binding ;	
CG32782-RB		1.77	unknown	unknown	
GM03914		1.77	unknown	unknown	
ewg		1.76	NAS : oogenesis;IMP : cellular process;NAS : regulation of transcription;ISS : regulation of transcription, DNA-dependent;IMP : salivary gland cell autophagic cell death;NAS : salivary gland cell autophagic cell death;TAS : cell death;IMP : autophagy;TAS : regulation of development, heterochronic ;	ISS : DNA binding;NAS : DNA binding;ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity ;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Mkrn1		1.74	IMP : skeletal muscle myosin thick filament assembly;IMP : muscle contraction;IMP : epithelial cell migration, open tracheal system;IMP : muscle cell differentiation;IMP : myofibril assembly;TAS : striated muscle contraction;IMP : locomotion ;	IEA : nucleic acid binding;IEA : protein binding;IEA : zinc ion binding ;	
CG31236-RB		1.73	unknown	unknown	
ben		1.72	IMP : response to chemical stimulus;IMP : jump response;TAS : grooming behavior;IEA : post-translational protein modification;IMP : grooming behavior;IMP : photoreceptor cell morphogenesis;IMP : flight behavior;IMP : axonogenesis;NAS : protein ubiquitination;IMP : axon target recognition ;	ISS : ubiquitin-protein ligase activity;IEA : acid-amino acid ligase activity;NAS : ubiquitin-protein ligase activity ;	
sba		1.71	ND	IEA : DNA binding ;	
bru-2		1.71	unknown	unknown	
CG42258		1.70	ND	ND	
CG14375		1.70	unknown	unknown	
Mmp1		1.70	ND	TAS : metalloendopeptidase activity;IEA : calcium ion binding;IEA : zinc ion binding;ISS : metalloendopeptidase activity;NAS : metalloendopeptidase activity ;	
Eip93F		1.69	IEP : salivary gland cell autophagic cell death;IEP : autophagic cell death ;	IEA : DNA binding;NAS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;NAS : DNA binding ;	
Btk29A		1.68	IDA : imaginal disc-derived male genitalia development;TAS : JNK cascade;IMP : oogenesis;TAS : dorsal closure;IMP : female germline ring canal formation;IMP : karyosome formation;IMP : ovarian fusome organization;IMP : ovarian nurse cell to oocyte transport ;	ISS : protein tyrosine kinase activity;IDA : protein tyrosine kinase activity;IEA : ATP binding;NAS : protein tyrosine kinase activity;IEA : protein binding ;	
trbd		1.66	IGI : positive regulation of Wnt receptor signaling pathway ;	IEA : zinc ion binding ;	
CG6403		1.65	IEA : lipid metabolic process ;	IEA : chitin binding ;	
shep		1.65	IMP : gravitaxis ;	ISS : mRNA binding;IEA : RNA binding;IEA : nucleotide binding ;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Ald		1.65	IDA : female meiosis;IMP : meiosis;IEA : protein phosphorylation;IMP : response to hypoxia;IDA : anaphase;IMP : meiotic metaphase I plate congression;IMP : spindle checkpoint;TAS : female meiosis chromosome segregation;IGI : distributive segregation;IDA : achiasmate meiosis I	NAS : protein kinase activity;IEA : ATP binding;IEA : protein serine/threonine kinase activity;	
14-3-3zeta		1.65	IGI : germarium-derived oocyte fate determination;NAS : olfactory learning;NAS : learning or memory;IGI : oocyte microtubule cytoskeleton polarization;IDA : protein folding;ISS : Ras protein signal transduction;IDA : protein stabilization	IEA : protein domain specific binding;IPI : protein binding;ISS : protein kinase C inhibitor activity;NAS : protein kinase C inhibitor activity;IDA : protein homodimerization activity;IPI : protein heterodimerization activity;ISS : tryptophan hydroxylase activator activity;	
CG10777		1.63	ND	IEA : ATP-dependent helicase activity;IEA : ATP binding;ISS : RNA helicase activity;IEA : nucleic acid binding;	
l(3)82Fd		1.63	NAS : transport;IMP : multicellular organismal development;ISS : transport;IEA : transmembrane transport;	ND	
foxo		1.63	IDA : cellularization;IGI : regulation of cell proliferation;TAS : locomotion;IGI : regulation of synapse organization;IGI : germ-line cyst formation;IGI : axon guidance;IGI : oocyte dorsal/ventral axis specification;IGI : germ cell development;IDA : negative regulation of translation;TAS : male courtship behavior;TAS : circadian rhythm;IMP : axonal fasciculation	ISS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IEA : sequence-specific DNA binding;	
desat1		1.62	IEA : fatty acid biosynthetic process;IEA : oxidation-reduction process;	ISS : stearoyl-CoA 9-desaturase activity;NAS : stearoyl-CoA 9-desaturase activity;	
HDC20349		1.61	unknown	unknown	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Pten		1.61	TAS : negative regulation of organ growth;TAS : apoptosis;TAS : negative regulation of insulin receptor signaling pathway;TAS : phosphoinositide dephosphorylation;TAS : negative regulation of growth;TAS : negative regulation of cell cycle;IGI : insulin receptor signaling pathway;TAS : negative regulation of cell size;	ISS : phosphoprotein phosphatase activity;IGI : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase activity;IEA : PDZ domain binding;ISS : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase activity;ISS : non-membrane spanning protein tyrosine phosphatase activity;IMP : protein serine/threonine phosphatase activity;ISS : actin binding;IEA : protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity;NAS : protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity;ISS : protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity;IEA : phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate 3-phosphatase activity;ISS : protein tyrosine phosphatase activity;IEA : magnesium ion binding;IMP : phosphoprotein phosphatase activity;	
CG13784		1.60	unknown	unknown	
CG6448		1.59	IEA : proteolysis;	unknown	
CG2941		1.59	IEA : transmembrane transport;	unknown	
neur		1.59	TAS : asymmetric cell division;TAS : ectoderm development;TAS : ovarian follicle cell development;TAS : compound eye development;IMP : germ-line stem cell maintenance;TAS : positive regulation of Notch signaling pathway	ISS : DNA binding;IDA : ubiquitin-protein ligase activity;IEA : protein binding;IEA : zinc ion binding;	
sima		1.59	IEA : regulation of transcription, DNA-dependent;IEA : signal transduction;NAS : regulation of transcription, DNA-dependent;IMP : response to DNA damage stimulus;	IEA : signal transducer activity;NAS : transcription activator activity;ISS : RNA polymerase II transcription factor activity;	
CG1553		1.59	unknown	unknown	
plexA		1.57	IMP : axon midline choice point recognition;IEA : signal transduction;IMP : axon guidance;NAS : motor axon guidance;	IPI : protein binding;TAS : semaphorin receptor activity;NAS : axon guidance receptor activity;ISS : semaphorin receptor activity;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
LP09564		1.57	IMP : R3/R4 cell fate commitment ; IGI : axon midline choice point recognition ; ISS : positive regulation of transcription, DNA-dependent ; IMP : locomotion involved in locomotory behavior ; IMP : regulation of gene-specific transcription ; IMP : R7 cell development ; IMP : inter-male aggressive behavior ; IMP : axon guidance ; NAS : axon guidance ; NAS : regulation of transcription from RNA polymerase II promoter ; IMP : axonogenesis ; IMP : nurse cell apoptosis ; IGI : axon guidance ; IMP : startle response ; IMP : antimicrobial humoral response ; IMP : axon midline choice point recognition ; IMP : brain morphogenesis ;	unknown	
CG7097		1.57	NAS : defense response ; IMP : response to pheromone ; IMP : cell surface receptor linked signaling pathway ; IEA : cell adhesion ;	unknown	
Akt1		1.57	TAS : insulin receptor signaling pathway ; TAS : positive regulation of organ growth ; TAS : regulation of protein import into nucleus ; TAS : positive regulation of cell size ; IGI : lipid storage ; IGI : chitin-based embryonic cuticle biosynthetic process ; TAS : open tracheal system development ; IGI : insulin receptor signaling pathway ; TAS : positive regulation of multicellular organism growth ; IGI : intracellular signaling pathway ; TAS : positive regulation of cell growth ; IDA : protein phosphorylation	IMP : protein serine/threonine kinase activity ; IEA : ATP binding ; NAS : phosphoinositide binding ; NAS : protein serine/threonine kinase activity ; IDA : protein kinase activity ; IDA : protein serine/threonine kinase activity ; ISS : protein serine/threonine kinase activity ;	
CG9007		1.57	IEA : cell adhesion ; IEA : protein phosphorylation ;	IEA : protein binding ; IEA : zinc ion binding ;	
CG5073		1.56	unknown	unknown	
Aps		1.56	ND	ISS : diphosphoinositol-polyposphate di-phosphatase activity ;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Dp1		1.56	TAS : defense response to Gram-positive bacterium; TAS : defense response to bacterium; NAS : defense response to bacterium; ISS : antibacterial humoral response; IDA : defense response to Gram-positive bacterium; IEP : antibacterial humoral response; NAS : positive regulation of biosynthetic process of antibacterial peptides active against Gram-positive bacteria;	IDA : single-stranded DNA binding; IDA : satellite DNA binding; TAS : single-stranded DNA binding; IDA : mRNA 3'-UTR binding;	
CG13907		1.55	IEA : transmembrane transport;	ISS : secondary active monocarboxylate transmembrane transporter activity;	
CG40351		1.55	ISS : chromatin remodeling;	IEA : nucleotide binding; ISS : histone-lysine N-methyltransferase activity; IEA : nucleic acid binding;	
lola		1.54	IGI : axon midline choice point recognition; ISS : positive regulation of transcription, DNA-dependent; IMP : regulation of gene-specific transcription; IMP : R7 cell development; IMP : inter-male aggressive behavior; NAS : regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; IMP : axonogenesis; IMP : nurse cell apoptosis; IGI : axon guidance	IEA : nucleic acid binding; ISS : transcription activator activity; IPI : protein binding; NAS : specific RNA polymerase II transcription factor activity; ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity; IEA : zinc ion binding; NAS : RNA polymerase II transcription factor activity;	
CG8536		1.54	IMP : sperm individualization; IDA : N-acetylglucosamine metabolic process; IMP : adult locomotory behavior; IMP : neuromuscular junction development; IDA : glycolipid biosynthetic process;	IDA : acetylgalactosaminyltransferase activity; IDA : N-acetyl-beta-glucosaminyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylgalactosaminyltransferase activity;	
yuri		1.54	IDA : microtubule basal body organization; IMP : sperm individualization; NAS : gravitaxis;	IEA : nucleotide binding;	
mys		1.53	ND	IEA : binding; TAS : receptor activity; IEA : receptor activity; TAS : cell adhesion molecule binding;	
kis		1.53	NAS : regulation of proteolysis;	IEA : DNA binding; IEA : chromatin binding; IEA : ATP binding; ISS : ATP-dependent helicase activity;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Fim		1.52	IMP : eggshell chorion assembly ;	NAS : actin binding;IEA : calcium ion binding;ISS : actin binding;IEA : actin binding;	
Fmr1		1.52	IMP : inter-male aggressive behavior;IEA : protein folding ;	IDA : mRNA binding;IDA : protein self-association;IDA : RNA binding;IPI : protein binding;ISS : mRNA binding;NAS : mRNA binding;	
S6k		1.52	TAS : regulation of cell size;NAS : positive regulation of organ growth;TAS : positive regulation of organ growth;TAS : response to nutrient;IMP : autophagy;TAS : positive regulation of growth;TAS : positive regulation of cell size;TAS : positive regulation of cell growth;TAS : positive regulation of multicellular organism growth	ISS : ribosomal protein S6 kinase activity;NAS : protein serine/threonine kinase activity;IEA : ATP binding;IDA : ribosomal protein S6 kinase activity;	
jim		1.52	ND	IEA : zinc ion binding;ISS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;	
cib		1.51	IEA : small GTPase mediated signal transduction;IEA : protein transport;IMP : peripheral nervous system development ;	ISS : actin binding;IDA : actin monomer binding;	
Myo95E		1.51	IMP : negative regulation of actin filament polymerization;IMP : imaginal disc-derived wing hair site selection;TAS : Wnt receptor signaling pathway;TAS : establishment of planar polarity;IMP : imaginal disc-derived wing morphogenesis;IMP : imaginal disc-derived wing hair organization ;	NAS : ATPase activity, coupled;IEA : ATP binding;IEA : motor activity ;	
lab		1.51	IEA : cell wall macromolecule catabolic process ;	NAS : specific RNA polymerase II transcription factor activity;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;TAS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IEA : sequence-specific DNA binding;ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity;	

Continue sur la page suivante

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore (suite)					
Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Rtnl1		1.50	IMP : olfactory behavior;IMP : inter-male aggressive behavior;	ND	
inx2		1.50	IMP : phototransduction;TAS : protein localization;NAS : phototransduction;IPI : phototransduction;IMP : detection of light stimulus involved in sensory perception;IMP : deactivation of rhodopsin mediated signaling;	NAS : gap junction channel activity	

TABLE 6.4 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Flore. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Certains gènes répondent dans la mouche entière et dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}*

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Xbp1	1.67		ISS : regulation of transcription;IDA : response to endoplasmic reticulum stress;IDA : endoplasmic reticulum unfolded protein response;IMP : lysosome organization;IEA : regulation of transcription, DNA-dependent;IMP : regulation of autophagy;	IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;ISS : protein homodimerization activity;ISS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IEA : sequence-specific DNA binding;IDA : transcription activator activity;IEA : protein dimerization activity;	ISS : nucleus;
Traf4	1.54		IMP : positive regulation of apoptosis;TAS : dorsal closure;NAS : defense response;IGI : positive regulation of JNK cascade;NAS : Toll signaling pathway;IGI : imaginal disc fusion, thorax closure;	IEA : zinc ion binding;IEA : ubiquitin-protein ligase activity;IPI : protein binding;	IDA : cytoplasm;IDA : apical cortex;
TotX	1.73		ISS : response to stress;	ND	ND
TotA	1.69		TAS : response to heat;IMP : response to stress;	ND	ND
Tom	1.56		IMP : cell fate specification;IGI : Notch signaling pathway;IMP : sensory organ precursor cell fate determination;IMP : sensory organ development;IMP : establishment of planar polarity;IMP : Notch signaling pathway;	ND	IDA : cytoplasm;
sala	2.01		unknown	unknown	unknown
retinin	1.79		ND	ND	ND
phr	1.56		ISS : immune response;IMP : defense response to Gram-positive bacterium;NAS : defense response;NAS : peptidoglycan catabolic process;IEA : peptidoglycan catabolic process;	ISS : deoxyribodipyrimidine photo-lyase activity;NAS : deoxyribodipyrimidine photo-lyase activity;	ND
mbl	1.51		IEA : cell wall macromolecule catabolic process;NAS : antimicrobial humoral response;	unknown	unknown
Lsp1beta	2.50		IEA : transport;	NAS : nutrient reservoir activity;IEA : oxygen transporter activity;	IDA : lipid particle;IDA : larval serum protein complex;NAS : extracellular region;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Eu}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
LBR	2.00		ISS : regulation of transcription from RNA polymerase II promoter;TAS : mid-gut development;IGI : brain segmentation;TAS : cell differentiation;IMP : brain development;IGI : brain development;IMP : embryo development;NAS : regulation of transcription from RNA polymerase II promoter;TAS : cell fate determination;	NAS : lamin binding;NAS : receptor activity;	NAS : nuclear inner membrane;IDA : nuclear inner membrane;IDA : nuclear envelope;
l(2)03659	1.76		IEA : cell redox homeostasis;	ISS : ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances;NAS : ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances;NAS : ATP binding;ISS : transporter activity;IEA : ATP binding;	NAS : integral to membrane;ISS : ATP-binding cassette (ABC) transporter complex;IEA : integral to membrane;
iotaTry	1.56		IMP : olfactory behavior;IMP : foregut morphogenesis;IMP : morphogenesis of embryonic epithelium;	ISS : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	NAS : extracellular region;
HDC11981	2.39		unknown	unknown	unknown
ft	1.78		IMP : regulation of macroautophagy;IGI : regulation of growth;IGI : regulation of insulin receptor signaling pathway;IMP : negative regulation of cell size;IMP : regulation of cell growth;IMP : cellular response to oxidative stress;IPI : insulin receptor signaling pathway;IMP : response to bacterium;IGI : insulin receptor signaling pathway;	IDA : cell adhesion molecule binding;ISS : receptor activity;IEA : calcium ion binding;ISS : cell adhesion molecule binding;	TAS : integral to membrane;NAS : integral to plasma membrane;ISS : integral to plasma membrane;IEA : plasma membrane;
Fkbp13	1.64		IMP : female meiosis chromosome segregation;	ISS : FK5ND6 binding;ISS : peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity;IEA : calcium ion binding;	ND
CT34147	1.78		unknown	unknown	unknown
CG8964	1.56		IEA : proteolysis;	IEA : transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;IEA : protein binding;IEA : ATP binding;	IEA : integral to membrane;
CG8299	1.63		IEA : transmembrane transport;ISS : mitochondrial transport;ISS : folic acid transport;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG7916	1.58		ND	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG6640	1.57		IEA : chitin metabolic process ;	unknown	unknown
CG4962	1.55		IEA : metabolic process ;	unknown	unknown
CG4066	1.73		unknown	unknown	unknown
CG2812	1.54		IEA : lipid metabolic process ;	ND	ND
CG17658	1.81		ND	IEA : zinc ion binding ;	ND
CG16898	1.78		unknown	unknown	unknown
CG15571	2.27		unknown	unknown	unknown
CG14205	2.01		ND	IEA : transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups ;	ND
CG13113	1.92		unknown	unknown	unknown
CG12716	2.03		unknown	unknown	unknown
CG11475	1.61		unknown	unknown	unknown
CG10051	1.55		IEA : proteolysis ;	IEA : peptidase activity ;	ND
Brd	1.50		IMP : cell fate specification ; TAS : sensory organ precursor cell fate determination ; IMP : sensory organ development ; IMP : Notch signaling pathway ;	ND	ND
Ama	1.67		NAS : cell adhesion ;	NAS : antigen binding ;	IDA : plasma membrane ; ISS : plasma membrane ;
CG4302	2.24	13.22	IEA : lipid metabolic process ;	ISS : glucuronosyltransferase activity ;	ND
CG15661	3.97	7.11	IEA : metabolic process ;	ISS : glucuronosyltransferase activity ;	ND
Edin	1.72	4.40	IEP : immune response	ND	IDA : extracellular space
GM130	3.55	2.61	unknown	ND	IDA : Golgi stack ; ISS : Golgi cis cisterna ; IDA : endoplasmic reticulum ;
Cht9	2.11	2.05	IMP : eggshell chorion gene amplification ; NAS : eggshell chorion assembly ; NAS : regulation of DNA replication ; IMP : chorion-containing eggshell formation ;	IDA : chitinase activity ; ISS : chitinase activity ; IEA : cation binding ;	IDA : extracellular space ;
Cyp12d1-d	2.29	1.81	IEA : oxidation-reduction process ;	IEA : electron carrier activity ; ISS : electron carrier activity ; IEA : heme binding ; NAS : electron carrier activity ; IEA : monooxygenase activity ;	ISS : mitochondrion ;
CG11788	1.79	1.76	unknown	unknown	unknown
SD27140	3.39	1.80	unknown	unknown	unknown
CG11474	1.79	1.54	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
sktl	1.61	1.55	NAS : phosphorylation;IMP : maintenance of oocyte nucleus location involved in oocyte dorsal/ventral axis specification;IMP : oocyte microtubule cytoskeleton polarization;IEP : salivary gland cell autophagic cell death;IEP : autophagic cell death;IEA : phosphatidylinositol metabolic process;IMP : cortical actin cytoskeleton organization;IMP : spermatid development;IMP : peripheral nervous system development;	TAS : 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity;NAS : 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity;ISS : 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity;	IDA : plasma membrane;ISS : nucleus;IDA : cell cortex;IDA : male germline ring canal;
S.CX000659	1.51	2.69	unknown	unknown	unknown
CG13905		3.32	unknown	unknown	unknown
CG31686		3.15	ISS : proteolysis;	ND	ND
Cp18		2.75	IEA : multicellular organismal development;NAS : eggshell chorion assembly;	TAS : structural constituent of chorion;NAS : structural constituent of chorion;	IEA : chorion;
CG10154		2.53	IEA : chitin metabolic process;	IEA : chitin binding;ISS : structural constituent of peritrophic membrane;	IEA : extracellular region;
Ugt37a1		2.46	IEA : metabolic process;	ISS : glucuronosyltransferase activity;	ND
Cp16		2.29	IEA : cytoskeleton organization;IMP : larval central nervous system remodeling;IMP : brain development;	NAS : structural constituent of chorion;	IEA : chorion;
CG18258		2.18	IEA : lipid metabolic process;	IEA : catalytic activity;	ND
CG33468		2.01	ND	ND	ND
CT34146		2.40	IGI : de novo' pyrimidine base biosynthetic process;	unknown	unknown
CG13323		2.04	unknown	unknown	unknown
GstD8		1.93	ND	TAS : glutathione peroxidase activity;ISS : glutathione transferase activity;	ND
CG3394		1.86	IEA : metabolic process;	IEA : catalytic activity;ISS : long-chain fatty acid transporter activity;	ND
CG13325		1.84	ND	IEA : transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups;	ND
CG11141		1.80	ND	ND	ND
CG30090		1.80	IEA : proteolysis;	IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
wbl		1.70	TAS : protein targeting to Golgi; TAS : maternal specification of dorsal/ventral axis, oocyte, soma encoded; IGI : protein processing; TAS : Toll signaling pathway; IGI : protein targeting to Golgi; IMP : regulation of multicellular organism growth; IEA : protein secretion; NAS : dorsal/ventral axis specification; TAS : embryo development ending in birth or egg hatching;	ND	TAS : endoplasmic reticulum; IEA : endoplasmic reticulum lumen;
T3dh		1.66	IEA : oxidation-reduction process;	IEA : oxidoreductase activity; IEA : metal ion binding;	ND
Cp19		1.60	NAS : eggshell chorion assembly; IEA : multicellular organismal development;	NAS : structural constituent of chorion;	IEA : chorion;
Femcoat		1.59	TAS : axonogenesis; IGI : axonogenesis;	NAS : structural constituent of chorion;	IDA : cytoplasm;
CG2893		1.59	ND	ISS : calcium, potassium : sodium antiporter activity;	IEA : integral to membrane;
IM18		1.55	TAS : salivary gland development; TAS : cell migration; IGI : maintenance of epithelial integrity, open tracheal system; IGI : muscle attachment; IGI : sensory perception of smell; TAS : cell-cell adhesion; TAS : imaginal disc-derived wing morphogenesis; IGI : salivary gland morphogenesis; TAS : tracheal outgrowth, open tracheal system; TAS : epithelial cell migration, open tracheal system; TAS : heterophilic cell-cell adhesion; TAS : midgut development; IDA : cell adhesion;	ND	IDA : extracellular region;
CG10910		1.55	unknown	unknown	unknown
S.C3L001530		1.52	unknown	unknown	unknown
CG7443		6.41	unknown	unknown	unknown
TotM		3.69	ISS : response to stress;	ND	ND
Drs		2.93	ISS : regulation of apoptosis; NAS : DNA fragmentation involved in apoptotic nuclear change; IMP : nurse cell apoptosis; IGI : anti-apoptosis;	ND	IDA : extracellular region;
CG9812		2.86	IEA : mannose metabolic process;	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG32277		2.66	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis ;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG9897		2.60	unknown	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG31681		2.50	IEA : transport ;	ISS : serine-type endopeptidase activity;	ISS : extracellular region ;
CG17239		2.48	IEA : proteolysis;NAS : proteolysis ;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
HDC08273		2.45	unknown	unknown	unknown
CG32834		2.36	ISS : proteolysis ;	IEA : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type peptidase activity;	ND
CG14606		2.15	IEA : transmembrane transport;IMP : phagocytosis, engulfment ;	ISS : hexose transmembrane transporter activity;	IEA : integral to membrane ;
IM2		2.01	IDA : defense response ;	ND	NAS : extracellular region;IDA : extracellular region ;
IM3		1.99	NAS : defense response;IDA : defense response ;	ND	IDA : extracellular region ;
CG30008		1.97	unknown	ND	IEA : integral to membrane ;
CG15673		1.94	unknown	unknown	unknown
CG14204		1.86	ND	IEA : transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups ;	ND
CG11275		1.83	ND	IEA : protein binding ;	ND
CG10570		1.77	unknown	unknown	unknown
Cyp4g1		1.74	IEA : oxidation-reduction process ;	IEA : heme binding;IEA : monooxygenase activity;ISS : electron carrier activity;IEA : electron carrier activity;NAS : electron carrier activity ;	NAS : membrane;NAS : microsome ;
CG18125		1.73	IEA : proteolysis ;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG6910		1.71	ND	IEA : iron ion binding;IEA : inositol oxygenase activity ;	IEA : cytoplasm ;
CG30154		1.68	IEA : proteolysis ;	ND	ND
IM4		1.66	NAS : Toll signaling pathway;IDA : defense response;IDA : antibacterial humoral response ;	ND	IDA : extracellular region;IDA : extracellular space ;
CG18107		1.60	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
puc		1.59	IDA : protein dephosphorylation;IMP : determination of adult lifespan;IGI : border follicle cell migration;TAS : JNK cascade;TAS : ovarian follicle cell development;IDA : wound healing;TAS : negative regulation of JNK cascade;TAS : dorsal closure;TAS : peripheral nervous system development;IDA : phosphoprotein phosphatase activity;TAS : MAP kinase tyrosine/serine/threonine phosphatase activity;TAS : JUN kinase phosphatase activity	IDA : endoplasmic reticulum;IDA : Golgi apparatus;	
HDC06105 Fbp1		1.59 1.59	ND TAS : nervous system development;ISS : regulation of transcription;IMP : central nervous system development;IMP : axon target recognition;IEA : regulation of transcription, DNA-dependent;	unknown IPI : protein transporter activity;ISS : protein transporter activity;IEA : oxygen transporter activity;	unknown IDA : lipid particle;
CG13482 Pde8		1.59 1.58	unknown ISA : sensory perception of chemical stimulus;IEA : transport;	unknown IEA : two-component response regulator activity;IDA : 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity;ISS : 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity;	unknown ND
chrw		1.58	unknown	TAS : GTPase activity;ISS : GTP binding;ISS : GTPase activity;IEA : GTP binding;	ISS : plasma membrane;
Cyt-b5-r		1.55	IEA : oxidation-reduction process;	NAS : electron carrier activity;IEA : heme binding;IEA : oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water;	IDA : mitochondrion;IDA : lipid particle;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Rel		1.54	TAS : Toll signaling pathway;TAS : positive regulation of antibacterial peptide biosynthetic process;TAS : immune response;IDA : innate immune response;TAS : response to bacterium;IDA : positive regulation of gene-specific transcription from RNA polymerase II promoter;TAS : defense response to Gram-negative bacterium;TAS : positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter;IGI : defense response to Gram-negative bacterium;TAS : signal transduction	IDA : transcription activator activity;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;NAS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;TAS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IDA : sequence-specific DNA binding;IPI : protein binding;IDA : DNA binding;	IDA : cytoplasm;IDA : nucleus;
JhI-26		1.54	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	ND	ND
Kaz1		1.51	IEA : proteolysis;	unknown	unknown
CG30283-RA		1.51	unknown	unknown	unknown
CG15044		1.51	unknown	unknown	unknown

TABLE 6.5 – Liste des gènes induits par la mutation *pims^{Ey}*

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Génotype. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Certains gènes répondent dans la mouche entière et dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Eu}*

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG15067	2.24		unknown	unknown	unknown
CG6295	2.10		unknown	ISS : triglyceride lipase activity ; IEA : phospholipase A1 activity ;	ND
CG10096	2.01		IEA : metabolic process ;	IEA : binding ; IEA : catalytic activity ;	ND
CG16778	1.97		IMP : gravitaxis ;	ISS : DNA binding ; IEA : protein binding ; NAS : DNA binding ;	ND
LvpD	1.87		IEA : transport ;	NAS : alpha-glucosidase activity ; IEA : cation binding ; ISS : alpha-glucosidase activity ;	ND
CG14125	1.86		IEA : chitin metabolic process ;	IEA : chitin binding ;	IEA : extracellular region ;
Rh5	1.82		IGI : phototransduction ; IEA : G-protein coupled receptor protein signaling pathway ; IMP : absorption of visible light ; NAS : phototransduction ; ISS : G-protein coupled receptor protein signaling pathway ;	ISS : G-protein coupled photoreceptor activity ; NAS : G-protein coupled photoreceptor activity ; IGI : G-protein coupled photoreceptor activity ;	IDA : rhabdomere ; NAS : integral to membrane ; ISS : integral to membrane ;
LysP	1.81		IEA : carbohydrate metabolic process ; NAS : glucose metabolic process ;	IEA : lysozyme activity ; ISS : lysozyme activity ; NAS : lysozyme activity ;	ND
Prx2540-2	1.81		IEA : cell redox homeostasis ; IDA : hydrogen peroxide catabolic process ;	NAS : peroxidase activity ; NAS : antioxidant activity ; ISS : glutathione peroxidase activity ; ISS : peroxidase activity ; ISS : antioxidant activity ; IDA : thioredoxin peroxidase activity ;	IDA : cytosol ;
Cyp6a23	1.78		IEA : oxidation-reduction process ;	IEA : electron carrier activity ; NAS : electron carrier activity ; IEA : monooxygenase activity ; ISS : electron carrier activity ; IEA : heme binding ;	NAS : microsome ; NAS : membrane ;
CG11044	1.78		unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Drep-1	1.76		Developemntal processes; TAS : zygotic determination of anterior/posterior axis, embryo;TAS : developmental pigmentation;TAS : dorsal/ventral axis specification;TAS : ovarian follicle cell development;TAS : imaginal disc-derived wing morphogenesis;TAS : dorsal closure;TAS : compound eye morphogenesis;TAS : cell fate specification;TAS : dorsal/ventral pattern formation, imaginal disc;TAS : progression of morphogenetic furrow involved in compound eye morphogenesis;TAS : heart development;TAS : negative regulation of cell proliferation;TAS : mesoderm development; ...	IEA : protein binding;	IEA : intracellular;
CG17633	1.72		IEA : proteolysis;	IEA : zinc ion binding;ISS : metalloproteinase activity;	ISS : extracellular space;
CG31259	1.70		unknown	unknown	unknown
CG1809	1.66		IEA : metabolic process;	ISS : alkaline phosphatase activity;	ND
CG33109	1.66		unknown	unknown	unknown
Obp57b	1.65		ISS : sensory perception of chemical stimulus;ISS : response to pheromone;IEP : sensory perception of smell;IEA : transport;ISS : olfactory behavior;ISA : sensory perception of chemical stimulus;	NAS : odorant binding;ISS : odorant binding;ISA : odorant binding;	ND
Obp56a	1.65		ISS : sensory perception of chemical stimulus;IEA : transport;ISS : response to pheromone;ISA : sensory perception of chemical stimulus;ISS : olfactory behavior;	ISS : odorant binding;NAS : odorant binding;ISA : odorant binding;	ISS : extracellular region;
CG13658	1.61		unknown	unknown	unknown
CG6337	1.60		IEA : lipid metabolic process;	ISS : cysteine-type endopeptidase activity;	ND
Uro	1.58		IEA : purine base metabolic process;IEA : oxidation-reduction process;TAS : allantoin biosynthetic process;	NAS : urate oxidase activity;ISS : urate oxidase activity;	NAS : peroxisome;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
inaD	1.57		TAS : immune response;IDA : defense response;	IDA : structural molecule activity;TAS : calmodulin binding;ISS : protein binding;TAS : receptor signaling complex scaffold activity;IMP : structural molecule activity;IPI : myosin III binding;TAS : myosin binding;	IPI : inaD signaling complex;IDA : plasma membrane;IDA : rhabdomere;TAS : inaD signaling complex;
CG17475	1.56		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG15254	1.53		IEA : proteolysis;	ISS : metalloendopeptidase activity;IEA : zinc ion binding;	ND
CG7203	1.53		IGI : negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway;IGI : protein phosphorylation;IMP : behavioral response to ethanol;IGI : positive regulation of TOR signaling cascade;NAS : protein phosphorylation;	unknown	unknown
CG31266	1.53		NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG16836	1.52		unknown	unknown	unknown
CG8952	1.51		IEA : proteolysis;IMP : dsRNA transport;	ISS : serine-type endopeptidase activity;NAS : endopeptidase activity;	ND
CG15658	1.51		ND	IEA : protein binding;	ND
CG34424	1.51		ND	ISS : 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase activity;	ISS : cytosol;
Cyp12a5	1.50		unknown	IEA : monooxygenase activity;ISS : electron carrier activity;IEA : heme binding;IEA : electron carrier activity;NAS : electron carrier activity;	ISS : mitochondrion;NAS : mitochondrion;
CG10513	1.50		unknown	unknown	unknown
CG32284	1.50		IEA : chitin metabolic process;	IEA : chitin binding;	IEA : extracellular region;
CG42235	1.50		IEA : transmembrane transport;ISS : vitamin transport;	ISS : sodium iodide symporter activity;ISS : sodium-dependent multivitamin transmembrane transporter activity;	ISS : integral to membrane;
S.C2R002789	1.67	1.76	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Glycogenin	1.66	1.84	TAS : ommatidial rotation; TAS : negative regulation of imaginal disc growth; IGI : regulation of organ growth; TAS : establishment of imaginal disc-derived wing hair orientation; IGI : establishment of ommatidial planar polarity; TAS : negative regulation of Wnt receptor signaling pathway; IGI : hippo signaling cascade; TAS : establishment of ommatidial planar polarity; IPI : peptide cross-linking; IGI : regulation of growth;	ISS : glycogenin glucosyltransferase activity;	ND
CG11170	1.63	1.91	ND	IEA : ATP binding; IEA : ATPase activity;	ND
CG9945	1.59	2.14	IEA : proteolysis;	ND	IDA : microtubule associated complex;
CG42365	1.56	3.79	IEA : proteolysis;	unknown	unknown
CG17024		2.59	IEA : purine nucleotide biosynthetic process;	ISS : phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase activity; IEA : ATP binding; ISS : phosphoribosylaminoimidazole carboxylase activity;	ND
ninaD		2.52	TAS : imaginal disc-derived wing vein morphogenesis; ISS : regulation of transcription;	ISS : scavenger receptor activity; IMP : scavenger receptor activity;	IEA : membrane; NAS : integral to plasma membrane;
CG6034		2.43	unknown	unknown	unknown
CG10505		2.21	IEA : transmembrane transport; IGI : response to copper ion; IGI : response to zinc ion;	IEA : ATP binding; ISS : ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; ISS : transporter activity;	ISS : ATP-binding cassette (ABC) transporter complex; IEA : integral to membrane;
ana		2.07	NAS : negative regulation of neuroblast proliferation; IEA : growth;	IEA : growth factor activity;	NAS : extracellular region;
CG8026		1.99	ND	ISS : transmembrane transporter activity; ISS : folic acid transporter activity; IEA : binding;	ISS : mitochondrial envelope; ISS : mitochondrial inner membrane;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
tim		1.97	TAS : negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; TAS : regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep; TAS : rhythmic behavior; IMP : mating behavior; TAS : eclosion rhythm; IMP : circadian behavior; TAS : locomotor rhythm; IGI : locomotor rhythm; TAS : entrainment of circadian clock; TAS : circadian rhythm; TAS : regulation of protein import into nucleus;	NAS : protein heterodimerization activity; TAS : protein heterodimerization activity; IPI : protein binding; TAS : protein binding;	IPI : protein complex; IDA : nucleus; NAS : cytoplasm; TAS : nucleus; TAS : cytoplasm; IDA : cytoplasm; NAS : nucleus;
CG10830		1.86	IEA : potassium ion transport;	IEA : voltage-gated potassium channel activity; IEA : protein binding;	IEA : voltage-gated potassium channel complex; IDA : plasma membrane;
Shaw		1.84	IMP : sleep; IEA : potassium ion transport; NAS : potassium ion transport; IEA : transmembrane transport; TAS : potassium ion transport;	IEA : voltage-gated potassium channel activity; IEA : protein binding; NAS : voltage-gated potassium channel activity; TAS : voltage-gated potassium channel activity;	NAS : integral to membrane; TAS : voltage-gated potassium channel complex; IEA : voltage-gated potassium channel complex; ISS : plasma membrane;
CG15819-RA gol		1.83	unknown	unknown	unknown
		1.83	IGI : Golgi organization;	IEA : zinc ion binding; IEA : protein binding;	NAS : nucleus;
if		1.81	IMP : female germline ring canal formation, actin assembly; IMP : ovarian fusome organization; TAS : fusome organization; TAS : female germline ring canal formation, actin assembly; IMP : adult somatic muscle development; TAS : germarium-derived oocyte fate determination; NAS : female germline ring canal formation, actin assembly; IMP : meiotic spindle organization; TAS : female germ-line cyst formation; TAS : germ-line cyst formation; IMP : sarcomere organization; TAS : spectrosome organization; IMP : testicular fusome organization; IMP : cystoblast division; IMP : centrosome organization;	IDA : receptor activity; IDA : cell adhesion molecule binding; ISS : receptor activity; ISS : cell adhesion molecule binding;	IDA : contractile fiber; NAS : integrin complex; ISS : integrin complex; TAS : integrin complex; IEA : integrin complex;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG8485		1.81	ND	NAS : protein serine/threonine kinase activity; IEA : ATP binding; ISS : SAP kinase activity;	ND
Transposon.39		1.79	unknown	unknown	unknown
CG9297		1.79	ND	IEA : GTPase activity; IEA : GTP binding; ISS : calcium ion binding;	ND
vanin-like		1.77	IEA : nitrogen compound metabolic process;	ISS : pantetheine hydrolase activity;	NAS : extrinsic to membrane;
CG7990		1.77	IEA : proteolysis;	ND	ND
vri		1.77	TAS : multicellular organismal development; TAS : rhythmic behavior; IMP : imaginal disc-derived wing hair organization; TAS : circadian rhythm; IMP : cellular process; NAS : circadian rhythm; IDA : circadian rhythm; NAS : transcription, DNA-dependent; NAS : locomotor rhythm; IEA : regulation of transcription, DNA-dependent; IMP : bristle morphogenesis;	IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity; ISS : protein homodimerization activity; IEA : sequence-specific DNA binding; TAS : transcription regulator activity; ISS : protein heterodimerization activity; NAS : RNA polymerase II transcription factor activity; IEA : protein dimerization activity;	NAS : nucleus; IEA : nucleus;
CG33173		1.76	ISS : transport; IEA : chitin metabolic process;	ISS : transporter activity; IEA : ATP binding; ISS : ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; IEA : chitin binding;	IEA : extracellular region; ISS : ATP-binding cassette (ABC) transporter complex;
lola		1.75	ND	IEA : nucleic acid binding; ISS : transcription activator activity; IPI : protein binding; NAS : specific RNA polymerase II transcription factor activity; ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity; IEA : zinc ion binding; NAS : RNA polymerase II transcription factor activity;	IDA : nucleus; NAS : nucleus;
Acox57D-d		1.74	IEA : oxidation-reduction process; IEA : fatty acid beta-oxidation;	ISS : acyl-CoA oxidase activity; IEA : flavin adenine dinucleotide binding; ISS : palmitoyl-CoA oxidase activity; IEA : acyl-CoA dehydrogenase activity;	ISS : peroxisome;
CG33966		1.73	ND	ISS : vitamin E binding;	ND
CG17922		1.73	IEA : transmembrane transport; IEA : ion transport;	ISS : intracellular cyclic nucleotide activated cation channel activity;	ISS : intracellular cyclic nucleotide activated cation channel complex;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
htl		1.72	ISS : response to heat;IEP : response to hypoxia;IMP : response to hypoxia;NAS : response to heat ;	IEA : protein binding;NAS : protein tyrosine kinase activity;ISS : fibroblast growth factor receptor activity;NAS : fibroblast growth factor receptor activity;TAS : fibroblast growth factor receptor activity;IEA : ATP binding;ISS : protein tyrosine kinase activity ;	NAS : integral to membrane;ISS : plasma membrane;ISS : integral to membrane ;
wb		1.70	unknown	unknown	unknown
CG9384		1.70	ND	ISS : alpha-1,3-mannosylglycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase activity ;	IEA : membrane ;
Act87E		1.69	ISS : cytoskeleton organization ;	ISS : structural constituent of cytoskeleton;IEA : protein binding;IEA : ATP binding ;	IDA : lipid particle;ISS : actin filament;NAS : actin filament ;
CG13806		1.69	IEA : chitin metabolic process ;	IEA : chitin binding ;	IEA : extracellular region ;
gpp		1.68	NAS : regulation of transcription, DNA-dependent;NAS : mesoderm development ;	unknown	unknown
CG6043		1.66	IEA : lipid metabolic process ;	unknown	unknown
BG642312		1.66	ND	ND	ND
CG31607		1.66	ISS : transport;IEA : chloride transport;IEA : sodium ion transport;ISS : amino acid transmembrane transport ;	ND	ND
Sema-1b		1.66	ISS : axon guidance;IEP : embryonic development via the syncytial blastoderm ;	IEA : receptor activity ;	NAS : plasma membrane;ISS : plasma membrane ;
norpA		1.65	TAS : calcium-mediated signaling;TAS : phospholipid biosynthetic process;TAS : elevation of cytosolic calcium ion concentration involved in G-protein signaling coupled to IP3 second messenger;IDA : deactivation of rhodopsin mediated signaling;TAS : phospholipid metabolic process;TAS : light-induced release of internally sequestered calcium ion;TAS : diacylglycerol biosynthetic process;TAS : phototransduction	TAS : phospholipase C activity;IEA : calcium ion binding;NAS : phosphoinositide phospholipase C activity;TAS : phosphoinositide phospholipase C activity;IEA : phosphoinositide phospholipase C activity;NAS : GTPase activator activity ;	IPI : inaD signaling complex;IDA : rhabdomere;TAS : inaD signaling complex;IDA : membrane fraction ;
CRMP		1.65	NAS : eggshell chorion assembly;IEA : multicellular organismal development ;	ISS : dihydropyrimidinase activity;NAS : dihydropyrimidinase activity ;	ND

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
nahoda		1.65	IMP : cell adhesion;TAS : muscle attachment;TAS : tracheal outgrowth, open tracheal system;IGI : hemocyte migration;ISS : calcium-dependent cell-matrix adhesion;TAS : dorsal closure;TAS : heterophilic cell-cell adhesion;TAS : epithelial cell migration, open tracheal system;TAS : midgut development;IGI : substrate-dependent cell migration, cell extension;TAS : cell migration;TAS : calcium-dependent cell-cell adhesion;TAS : cell-matrix adhesion	unknown	unknown
CG7582		1.64	unknown	ND	IEA : integral to membrane;
CG4752		1.63	IEA : proteolysis;	ISS : 5-oxoprolinase (ATP-hydrolyzing) activity;	ND
CG13810		1.63	unknown	unknown	unknown
CG32302		1.63	IEA : chitin metabolic process;	IEA : chitin binding;	IEA : extracellular region;
CG34452		1.63	ISS : protein glycosylation;	ISS : galactosyltransferase activity;	ND
dsx		1.63	IMP : axon guidance;IGI : haltere development;NAS : protein phosphorylation;IMP : signal transduction;IEA : Wnt receptor signaling pathway;TAS : olfactory learning;IMP : olfactory learning;IMP : salivary gland morphogenesis;IEA : protein phosphorylation;IMP : learning or memory;IMP : muscle attachment;IMP : memory;IMP : axon midline choice point recognition;	NAS : mRNA binding;IDA : protein homodimerization activity;TAS : transcription regulator activity;NAS : specific RNA polymerase II transcription factor activity;IPI : protein binding;NAS : zinc ion binding;ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity;TAS : DNA binding;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;NAS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;NAS : DNA binding;TAS : RNA polymerase II transcription factor activity;	ISS : nucleus;
Transposon.59		1.63	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Eip74EF		1.62	TAS : female somatic sex determination; TAS : behavior; TAS : male courtship behavior, veined wing generated song production; IGI : imaginal disc-derived female genitalia development; TAS : male sex differentiation; TAS : genital disc development; IGI : imaginal disc-derived male genitalia development; TAS : positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; TAS : central nervous system development; TAS : nuclear mRNA splicing, via spliceosome; TAS : male courtship behavior; TAS : somatic sex determination; TAS : sex determination; TAS : sex differentiation; TAS : regulation of imaginal disc growth; TAS : regulation of transcription; TAS : negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; TAS : genital disc morphogenesis; TAS : negative regulation of developmental pigmentation; NAS : sex-specific pigmentation; NAS : positive regulation of transcription, DNA-dependent; TAS : female sex differentiation; TAS : genital disc sexually dimorphic development; TAS : sex-specific pigmentation; TAS : sex comb development;	IEA : sequence-specific DNA binding; ISS : specific RNA polymerase II transcription factor activity; IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity; TAS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;	NAS : nucleus; ISS : nucleus;
CG7000-RA		1.61	ND	unknown	unknown
CG31636		1.61	ND	IEA : transporter activity;	IEA : intracellular;
CG8318-RA		1.60	IEA : lipid metabolic process; ISS : lipid metabolic process;	unknown	unknown
CG10550		1.60	unknown	unknown	unknown
CG11883		1.60	IEA : nucleotide catabolic process;	ISS : 5'-nucleotidase activity;	ND
GM05003		1.60	unknown	unknown	unknown
CG18604		1.59	unknown	unknown	unknown
CG12054		1.59	ND	IEA : nucleic acid binding; IEA : zinc ion binding;	IEA : intracellular;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Vha68-1		1.59	IEA : ATP synthesis coupled proton transport;NAS : proton transport;	IEA : hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism;ISS : hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism;NAS : hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism;IEA : proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism;IEA : ATP binding;	NAS : vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain;ISS : vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain;IDA : plasma membrane;
CG3759		1.59	IEA : oxidation-reduction process;	ISS : iron ion transmembrane transporter activity;ISS : ferroxidase activity;IEA : copper ion binding;	ND
chif		1.58	IEA : metabolic process;	IEA : DNA binding;IEA : zinc ion binding;	ND
Sans		1.58	ND	ISS : protein binding;	ISS : cytoplasm;IDA : early endosome;
CG33205		1.58	IEP : mesoderm development;	IEA : protein binding;	ND
exex		1.56	TAS : autophagic cell death;NAS : regulation of transcription;IEP : autophagic cell death;TAS : phagocytosis, engulfment;IMP : activation of caspase activity;TAS : larval midgut histolysis;TAS : ecdysone-mediated induction of salivary gland cell autophagic cell death;IMP : induction of apoptosis by hormones;IEP : salivary gland cell autophagic cell death;TAS : positive regulation of transcription, DNA-dependent;NAS : salivary gland cell autophagic cell death;IMP : autophagy;	ISS : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;IEA : sequence-specific DNA binding;IEA : sequence-specific DNA binding transcription factor activity;	ISS : nucleus;
CG33275		1.56	IEA : regulation of Rho protein signal transduction;	ISS : guanyl-nucleotide exchange factor activity;IEA : Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity;	IEA : intracellular;
CG10163		1.56	IMP : cell adhesion;IMP : regulation of cell shape;IEA : lipid metabolic process;	ISS : phospholipase A1 activity;	ND
CG31547		1.56	IEA : transmembrane transport;ISS : organic cation transport;	ISS : amino acid transmembrane transporter activity;ISS : sodium :potassium :chloride symporter activity;	IEA : integral to membrane;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG8399		1.56	IMP : determination of adult lifespan;IMP : locomotor rhythm;IMP : positive regulation of multicellular organism growth;IMP : regulation of Ras protein signal transduction;IMP : response to oxidative stress;IMP : cAMP-mediated signaling;IMP : olfactory learning;IMP : short-term memory;IMP : response to heat;IGI : Ras protein signal transduction;IMP : regulation of multicellular organism growth;IMP : positive regulation of adenylate cyclase activity;IGI : perineurial glial growth;	ND	IEA : integral to membrane;
fax		1.55	IMP : imaginal disc morphogenesis;TAS : muscle organ development;IMP : muscle organ development;IMP : negative regulation of synaptic growth at neuromuscular junction;IMP : central nervous system development;	ND	ND
CG10082		1.55	ISS : protein phosphorylation;ISS : phosphatidylinositol metabolic process;	IEA : inositol trisphosphate 3-kinase activity;ISS : inositol or phosphatidylinositol kinase activity;	ISS : cytoplasm;
CG30282-RA		1.54	IEA : transmembrane transport;	unknown	unknown
GM02743		1.54	IEP : mesoderm development;	unknown	unknown
CG11299		1.53	IMP : mitochondrion degradation;IMP : inter-male aggressive behavior;IMP : regulation of oxygen and reactive oxygen species metabolic process;IMP : negative regulation of cell growth;IMP : multicellular organismal aging;IEA : cell cycle arrest;	ND	IEA : nucleus;NAS : nucleus;
nuf		1.53	unknown	ISS : microtubule binding;	IDA : perinuclear region of cytoplasm;IDA : centrosome;TAS : centrosome;ISS : microtubule associated complex;IEA : intracellular membrane-bounded organelle;
CG3301		1.53	IEA : oxidation-reduction process;	ISS : oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor;IEA : binding;	ND

Continue sur la page suivante

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation <i>pims^{Ey}</i> (suite)					
Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Mlc2		1.53	ND	NAS : calcium ion binding;IEA : calcium ion binding;ISS : ATPase activity, coupled;NAS : microfilament motor activity; unknown	ISS : myosin complex;NAS : muscle myosin complex;
CG30445-RA		1.52	IEA : regulation of ARF GTPase activity;ISS : small GTPase mediated signal transduction;		unknown
Tango11		1.52	ND	ND	IDA : endoplasmic reticulum;
CG11158		1.52	unknown	unknown	unknown
CG9993		1.51	ND	ISS : 4-coumarate-CoA ligase activity;	ND
Tm2		1.50	IMP : heart development;	ISS : actin binding;	NAS : muscle thin filament troponomyosin;
CG5177		1.50	ND	ISS : trehalose-phosphatase activity;	ND
CG8012		1.50	unknown	unknown	unknown
Ac76E		1.50	IEA : cyclic nucleotide biosynthetic process;IEA : intracellular signaling pathway;	NAS : adenylate cyclase activity;ISS : adenylate cyclase activity;	ND

TABLE 6.6 – Liste des gènes réprimés par la mutation *pims^{Ey}*

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Génotype. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Certains gènes répondent dans la mouche entière et dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
Jon66Ci	4.69	2.20	Protéolyse	Endopeptidase	ND
PGRP-SC1	3.91	1.76	Immunité	Amidase	Sécrété
CG18179	2.23	1.99	Protéolyse	Endopeptidase	ND
Maltase A7	2.42	2.15	Métabolisme des Sucres	α -glucosidase	ND
CG15533	2.28	1.64	Métabolisme de la sphingo-myeline	Phosphodiesterase	ND
Maltase A8	2.14	1.77	Métabolisme des Sucres	α -glucosidase	ND
Maltase A4	2.10	1.92	Métabolisme des Sucres	α -glucosidase	ND
CG16965	1.84	1.90	Métabolisme des Sucres	α -trehalase	ND

TABLE 6.7 – Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont induits en présence de la flore bactérienne.

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Flore. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG4302	2.24	13.22	Métabolisme des Lipides	glucuronosyltransferase	ND
CG15661	3.97	7.11	Métabolisme	glucuronosyltransferase	ND
Edin	1.72	4.40	Immunité	ND	Extracellulaire
GM130	3.55	2.61	ND	ND	Golgi, ER
Cht9	2.11	2.05	Formation du chorion	chitinase	Extracellulaire
Cyp12d1-d	2.29	1.81	Oxidation-Réduction	Porteur d'élec- trons	Mitochondrie
CG11788	1.79	1.76	ND	ND	ND
SD27140	3.39	1.80	ND	ND	ND
CG11474	1.79	1.54	ND	ND	ND
sktl	1.61	1.55	Phosphorylation	kinase du phos- phatidylinositol	membranaire
S.CX000659	1.51	2.69	ND	ND	ND

TABLE 6.8 – Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont induits par la mutation *pims^{Ey}*.

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Génotype. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué). SD27140 n'est pas un gène mais un clone contenant un ADN complémentaire (GenBank :AY119280), S.CX000659 est une séquence de Affymetrix qui ne correspond pas non plus à un gène connu du génome de la drosophile.

Gène	Mouche	Intestin	GO BP	GO MF	GO CC
CG11170	1.63	1.91	ND	Fixation à l'ATP & ATPase	ND
Glycogenin	1.66	1.84	Régulation de la Croissance	glucosyltransferase	ND
CG42365	1.56	3.79	Protéolyse	ND	ND
S.C2R002789	1.67	1.76	ND	ND	ND
CG9945	1.59	2.14	Protéolyse	ND	Microtubules

TABLE 6.9 – Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont réprimés par la mutation *pims^{Ey}*.

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Génotype. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué). S.C2R002789 est une séquence de Affymetrix qui ne correspond pas à un gène connu du génome de la drosophile.

TABLE 6.10 – Liste des gènes induits en mouche entière par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}*

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
AttD	2.45	6.89	ISS : antibacterial humoral response ;	ND	IEA : extracellular region ;
Cyp6a17	1.72	2.68	IEA : oxidation-reduction process ;	IEA : electron carrier activity ; IEA : monooxygenase activity ; NAS : electron carrier activity ; IEA : heme binding ; ISS : electron carrier activity ;	NAS : microsome ; NAS : membrane ;
CG5550	1.61	2.15	IEA : signal transduction ; NAS : proteolysis ;	IEA : receptor binding ;	ISS : proteinaceous extracellular matrix ; IEA : extracellular space ;
CG14219	2.06	2.45	ND	IEA : transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups ;	ND
CG16775	2.62	2.42	unknown	unknown	unknown
Npc2d	2.19	2.03	TAS : calcium-mediated signaling ; TAS : phospholipid biosynthetic process ; TAS : elevation of cytosolic calcium ion concentration involved in G-protein signaling coupled to IP3 second messenger ; IDA : deactivation of rhodopsin mediated signaling ; TAS : phospholipid metabolic process ; TAS : light-induced release of internally sequestered calcium ion ; TAS : diacylglycerol biosynthetic process ; TAS : phototransduction	unknown	unknown
PGRP-LB	1.64	1.74	IEA : signal transduction ; IEP : mesoderm development ; IEA : two-component signal transduction system (phosphorelay) ; IEA : regulation of transcription, DNA-dependent ;	NAS : peptidoglycan binding ; TAS : peptidoglycan binding ; NAS : amidase activity ; IEA : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity ; ISS : peptidoglycan binding ; IPI : protein binding ;	IDA : extracellular region ; NAS : integral to plasma membrane ;
Jon66Cii	5.38	1.84	IEA : proteolysis ; NAS : proteolysis ;	NAS : serine-type endopeptidase activity ; ISS : serine-type endopeptidase activity ;	ND
CG5246	2.53	1.84	IEA : trehalose biosynthetic process ;	IEA : serine-type endopeptidase activity ; NAS : serine-type endopeptidase activity ;	ND
CG15534	2.35	1.73	ISS : sphingomyelin metabolic process ; IEA : sphingomyelin catabolic process ;	ISS : sphingomyelin phosphodiesterase activity ;	ND
CG18585	1.72	1.73	IEA : proteolysis ;	IEA : metallocarboxypeptidase activity ; IEA : zinc ion binding ;	ND
CG7025	2.14	1.73	IEA : inositol catabolic process ; IEA : oxidation-reduction process ;	ISS : metallocarboxypeptidase activity ; IEA : zinc ion binding ;	ND
CG14499-RA	2.70	1.72	unknown	unknown	unknown

Continue sur la page suivante

TABLE 6.10 – Liste des gènes induits en mouche entière par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
MtnB	1.88	1.69	IMP : dorsal trunk growth, open tracheal system;IEA : proteolysis;IEP : salivary gland cell autophagic cell death;IGI : cell adhesion;IMP : imaginal disc eversion;IMP : instar larval development;IMP : open tracheal system development;IMP : basement membrane disassembly;IMP : regulation of tube length, open tracheal system;IEP : autophagic cell death;	NAS : metal ion binding;IDA : copper ion binding;	ND
CG31343	1.89	1.69	IEA : proteolysis;	ISS : aminopeptidase activity;IEA : zinc ion binding;IEA : metallopeptidase activity;	ND
CG31704	1.90	1.65	ND	ISS : serine-type endopeptidase inhibitor activity;	IDA : extracellular space
CG31265	1.61	1.64	unknown	NAS : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG8997	1.89	1.63	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	ND	ND
CG10827	1.59	1.62	IEA : metabolic process;	ISS : alkaline phosphatase activity;	ND
Jon44E	1.84	1.57	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	ISS : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG2772	1.66	1.57	IEA : DNA repair;	ISS : triglyceride lipase activity;	ND
MtnD	1.55	1.56	ND	IEA : metal ion binding;	ND
CG31269	1.55	1.52	IEA : proteolysis;	ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG8773	1.90	1.52	IEA : carbohydrate metabolic process;	IEA : metallopeptidase activity;ISS : aminopeptidase activity;IEA : zinc ion binding;	ND
CG10476	1.98	2.48	unknown	unknown	unknown

TABLE 6.10 – Liste des gènes induits en mouche entière par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}*

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant *pims^{Ey}* par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

TABLE 6.11 – Liste des gènes induits dans l'intestin par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}*

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
CG31091	7.03	3.01	IEA : lipid metabolic process ;	ISS : triglyceride lipase activity ;	ND
Def	5.40	7.23	IEA : oxidation-reduction process ;	ND	IDA : extracellular space ;
AttD	3.45	17.71	ISS : antibacterial humoral response ;	ND	IEA : extracellular region ;
CG10476	2.92	4.04	unknown	unknown	unknown
CG11192	2.89	2.49	NAS : proteolysis ; IEA : proteolysis ;	NAS : serine-type endopeptidase activity ; IEA : serine-type endopeptidase activity ;	ND
Try29F	2.75	2.64	NAS : proteolysis ; IEA : proteolysis ;	ISS : serine-type endopeptidase activity ; IEA : serine-type endopeptidase activity ; NAS : serine-type endopeptidase activity ;	ND
CG4267	2.47	3.41	unknown	ISS : phospholipase activity ;	ND
CG9682	2.37	2.01	IEA : mannose metabolic process ;	unknown	unknown
Transposon.27	2.31	2.95	unknown	unknown	unknown
DptB	2.30	20.47	IMP : chromosome segregation ; IDA : heterochromatin formation ; IMP : chromosome condensation ; IDA : positive regulation of translation ;	ND	IDA : extracellular space ;
CG7402	2.27	1.97	NAS : protein dephosphorylation ; ISS : protein dephosphorylation ;	ISS : N-acetylgalactosamine-4-sulfatase activity ;	ND
PGRP-SD	2.23	5.58	ISS : peptidoglycan catabolic process ; ISS : innate immune response ; NAS : defense response ; ISS : immune response ;	IEA : protein binding ; NAS : peptidoglycan binding ; IEA : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity ; ISS : peptidoglycan binding ;	ISS : extracellular region ; NAS : integral to plasma membrane ;
CG16995	2.19	2.30	ND	ND	IEA : extracellular region ;
TsfI	2.15	2.85	NAS : iron ion transport ; IEA : iron ion transport ; NAS : defense response ; ISS : cellular iron ion homeostasis ;	ISS : ferric iron binding ; ISS : iron ion transmembrane transporter activity ; NAS : iron ion transmembrane transporter activity ;	IEA : extracellular region ;
CG4563	2.03	1.72	IEA : metabolic process ;	ISS : 4-coumarate-CoA ligase activity ;	ND
PGRP-LB	2.02	2.11	IEA : signal transduction ; IEP : mesoderm development ; IEA : two-component signal transduction system (phosphorelay) ; IEA : regulation of transcription, DNA-dependent ;	NAS : peptidoglycan binding ; TAS : peptidoglycan binding ; NAS : amidase activity ; IEA : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity ; ISS : peptidoglycan binding ; IPI : protein binding ;	IDA : extracellular region ; NAS : integral to plasma membrane ;
CG14456	2.00	1.99	unknown	unknown	unknown
CG14219	1.99	2.24	ND	IEA : transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups ;	ND
CG5550	1.97	2.96	IEA : signal transduction ; NAS : proteolysis ;	IEA : receptor binding ;	ISS : proteinaceous extracellular matrix ; IEA : extracellular space ;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.11 – Liste des gènes induits dans l'intestin par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}* (suite)

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
CG10469	1.96	2.17	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;IEA : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG31704	1.94	1.55	ND	ISS : serine-type endopeptidase inhibitor activity;	IDA : extracellular space
CG13077	1.90	2.50	ND	ND	IEA : integral to membrane;
CG30263	1.84	2.79	ND	unknown	unknown
CG16775	1.83	2.00	unknown	unknown	unknown
CG13335	1.75	1.82	unknown	unknown	unknown
CG5770	1.73	2.41	IEA : signal transduction;	unknown	unknown
PGRP-LF	1.72	2.21	TAS : phagocytosis;TAS : positive regulation of antibacterial peptide biosynthetic process;IDA : antibacterial humoral response;TAS : defense response to Gram-negative bacterium;TAS : innate immune response;IEA : peptidoglycan catabolic process;	IDA : peptidoglycan binding;IEA : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity;NAS : peptidoglycan binding;IEA : protein binding;	IDA : external side of cell outer membrane;NAS : integral to plasma membrane;
PGRP-LC	1.65	1.67	ISS : immune response;NAS : peptidoglycan metabolic process;IEA : peptidoglycan catabolic process;NAS : defense response;IDA : defense response to Gram-positive bacterium;NAS : detection of bacterium;	IEA : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity;TAS : peptidoglycan receptor activity;TAS : pattern recognition receptor activity;IDA : peptidoglycan binding;TAS : peptidoglycan binding;IDA : Gram-negative bacterial cell surface binding;	ISS : integral to membrane;NAS : integral to plasma membrane;NAS : integral to membrane;TAS : integral to membrane;
NC2alpha	1.60	2.21	unknown	IEA : sequence-specific DNA binding;NAS : general transcriptional repressor activity;	IEA : intracellular;NAS : negative cofactor 2 complex;
Atg7	1.59	1.58	IMP : larval midgut cell programmed cell death;IMP : determination of adult lifespan;IMP : regulation of defense response to virus;IMP : autophagy;IMP : macroautophagy;	IEA : binding;IEA : catalytic activity;	IEA : cytoplasm;
CG34198	1.57	1.61	unknown	unknown	unknown

TABLE 6.11 – Liste des gènes induits dans l'intestin par la présence de la flore et par la mutation *pims^{Ey}*

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant *pims^{Ey}* par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué). Transposon.27 est une séquence de Affymetrix qui ne correspond pas à un gène connu du génome de la drosophile.

Gène	Intestin		Mouche		GO BP	GO MF	GO CC
	Flore	Génotype	Flore	Génotype			
CG16775	1.83	2.00	2.62	2.42	ND	ND	ND
AttD	3.45	17.71	2.45	6.89	Immunité	Peptide anti-microbien	Sécrété
CG14219	1.99	2.24	2.06	2.45	ND	acyltransferase	ND
CG31704	1.94	1.55	1.90	1.65	ND	Inhibiteur de protéases à sérine	Extracellulaire
PGRP-LB	2.02	2.11	1.64	1.74	Immunité	amidase	Sécrété
CG5550	1.97	2.96	1.61	2.15	Signalisation	Fixation à récepteur	Extracellulaire

TABLE 6.12 – Liste des gènes communs à l'intestin et la mouche entière qui sont induits en présence de la flore ou par la mutation *pims^{Ey}*.

Les gènes présentés ici répondent uniquement au facteur Génotype. La colonne "Mouche" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en mouche entière. La colonne "Intestin" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans l'intestin. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
CG13947	2.77	1.81	ND	ND	ND
CG4830	1.62	1.69	ND	Transporteur d'acides gras à longues chaînes (ISS)	ND

TABLE 6.13 – Liste des gènes qui sont réprimés en mouches entières en présence de la flore ou de la mutation *pims^{Ey}*.

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant *pims^{Ey}* par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
hts	1.56	2.05	TAS : gonad development; TAS : fibroblast growth factor receptor signaling pathway; TAS : heart development; TAS : salivary gland development; TAS : pole cell migration; TAS : mesoderm migration involved in gastrulation; IGI : mesodermal cell fate commitment	ISS : actin binding; IEA : metal ion binding;	IDA : plasma membrane; IDA : germline ring canal; TAS : germline ring canal; IDA : spectrosome; TAS : spectro-some; IDA : fusome; TAS : female germline ring canal inner rim; TAS : fusome; IDA : lipid particle
CG13868	2.04	2.37	unknown	unknown	unknown
CG31530	2.21	2.09	unknown	ISS : secondary active organic cation transmembrane transporter activity;	ND
LpR2	1.88	1.57	unknown	ISS : low-density lipoprotein receptor activity; IEA : calcium ion binding;	IEA : membrane;
drl	1.55	1.55	ISS : antibacterial humoral response;	IEA : ATP binding; NAS : protein tyrosine kinase activity; IEA : transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity; IPI : Wnt-protein binding; ISS : transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity; NAS : transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;	ISS : plasma membrane; IEA : integral to plasma membrane;

TABLE 6.14 – Liste des gènes qui sont réprimés dans l'intestin en présence de la flore ou de la mutation *pims^{Ey}*.

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant *pims^{Ey}* par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

TABLE 6.15 – Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation *pims^{Ey}* dans la mouche entière

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
pirk	2.50	3.76	IMP : negative regulation of immune response;IMP : negative regulation of innate immune response;IMP : response to symbiotic bacterium;	ND	ND
Oamb	1.76	1.50	IGI : wing disc dorsal/ventral pattern formation;ISS : microtubule-based process;IMP : actin cytoskeleton reorganization;IEA : protein transport;	ISS : G-protein coupled amine receptor activity;IDA : octopamine receptor activity;NAS : octopamine receptor activity;	ISS : integral to membrane;NAS : plasma membrane;IC : integral to plasma membrane;
CG12374	3.05	2.48	IEA : proteolysis;	ISS : metallocarboxypeptidase activity;IEA : zinc ion binding;	ND
CG31463	1.80	2.39	IEA : proteolysis;	unknown	unknown
CG17147	1.94	1.97	ND	ISS : structural constituent of peritrophic membrane;	ND
CG11911	1.83	1.97	IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG7631	1.74	1.92	IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	ISS : metalloendopeptidase activity;IEA : zinc ion binding;	ND
CG6296	2.40	1.91	ND	IEA : phospholipase A1 activity;ISS : triglyceride lipase activity;	ND
Jon25Bii	2.44	1.87	ND	NAS : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG8774	1.61	1.80	IEA : carbohydrate metabolic process;	IEA : zinc ion binding;IEA : metallopeptidase activity;ISS : aminopeptidase activity;	ND
CG14120	1.55	1.79	ND	IEA : nucleic acid binding;IEA : hydrolase activity;IEA : metal ion binding;	ND
CG30272	1.58	1.79	unknown	ND	ND
CG3819	2.12	1.77	ND	IEA : nucleic acid binding;IEA : metal ion binding;IEA : hydrolase activity;	ND
CG13492	1.65	1.76	unknown	unknown	unknown
Jon65Aii	1.89	1.67	IEA : proteolysis;NAS : proteolysis;	NAS : serine-type endopeptidase activity;ISS : serine-type endopeptidase activity;	ND
Amy-d	2.34	1.65	IEA : carbohydrate metabolic process;	ISS : alpha-amylase activity;IEA : cation binding;NAS : alpha-amylase activity;NAS : calcium ion binding;	ND
CG30047	1.70	1.63	IEA : proteolysis;	IEA : peptidase activity;	ND
Muc68E	1.63	1.61	unknown	IEA : chitin binding;	IEA : extracellular region;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.15 – Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation $pims^{Ey}$ dans la mouche entière (suite)

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
Mdr50	1.52	1.61	IMP : axon extension involved in development;IMP : oogenesis;NAS : dorsal closure;IMP : epidermis development;IMP : imaginal disc-derived wing hair organization;IMP : regulation of compound eye photoreceptor development;	ISS : drug transmembrane transporter activity;NAS : drug transmembrane transporter activity;ISS : ATPase activity, coupled;IEA : ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances;IEA : ATP binding;	IEA : integral to membrane;
CG3734	1.64	1.60	IEA : proteolysis;	ISS : serine-type peptidase activity;	ND
CG16749	1.58	1.59	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	IEA : serine-type endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND
CG30043	1.54	1.57	IEA : transmembrane transport;ISS : carbohydrate transport;IDA : trehalose transport;	IEA : peptidase activity;	ND
MtnC	1.81	1.55	NAS : cellular metal ion homeostasis;	IEA : metal ion binding;	ND
CG5150	2.73	1.55	unknown	ISS : alkaline phosphatase activity;	ND
CG3841	1.62	1.55	ND	ISS : carboxylesterase activity;	ND
Jon99Ci	1.94	1.50	NAS : proteolysis;IEA : proteolysis;	ISS : serine-type endopeptidase activity;NAS : endopeptidase activity;NAS : serine-type endopeptidase activity;	ND

TABLE 6.15 – Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation $pims^{Ey}$ dans la mouche entière

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant $pims^{Ey}$ par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

TABLE 6.16 – Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation *pims^{Ey}* dans l'intestin

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
pirk	3.45	26.55	IMP : negative regulation of immune response;IMP : negative regulation of innate immune response;IMP : response to symbiotic bacterium;	ND	ND
CG31089	4.87	2.47	ND	ISS : triglyceride lipase activity;	ND
bt	2.58	2.35	IMP : imaginal disc-derived wing vein morphogenesis;	ND	ND
sls	2.24	2.03	IMP : skeletal muscle tissue development;IMP : muscle attachment;IMP : sister chromatid cohesion;TAS : muscle organ development;IMP : mitotic chromosome condensation;IEP : mesoderm development;IMP : locomotion;IMP : sarcomere organization;IMP : myoblast fusion;IGI : sarcomere organization;	IMP : actin binding;IMP : structural constituent of muscle;ISS : myosin light chain kinase activity;IEA : nucleic acid binding;IDA : actin binding;	IMP : Z disc;IDA : Z disc;IDA : condensed nuclear chromosome;IDA : microtubule associated complex;IDA : sarcomere;
stumps	2.07	1.85	NAS : gastrulation;TAS : epithelial cell migration, open tracheal system;TAS : fibroblast growth factor receptor signaling pathway;TAS : mesodermal cell migration;NAS : heart development;IMP : open tracheal system development;NAS : mesoderm migration involved in gastrulation;TAS : primary branching, open tracheal system;	ND	TAS : intracellular;TAS : cytoplasm;NAS : cytoplasm;
dpp	1.58	1.84	IMP : cuticle hydrocarbon biosynthetic process;NAS : fatty acid biosynthetic process;IEA : oxidation-reduction process;IEA : lipid metabolic process;IMP : pheromone biosynthetic process;	IDA : specific transcriptional repressor activity;IPI : protein binding;TAS : morphogen activity;IPI : protein homodimerization activity;IPI : protein heterodimerization activity;IEA : growth factor activity	IDA : extracellular space;NAS : extracellular region;IDA : intracellular;
CG9682	2.37	1.81	IEA : mannose metabolic process;	unknown	unknown
CG17136-RD	1.75	1.77	NAS : nuclear mRNA splicing, via spliceosome;IMP : RNA splicing;ISS : mRNA splice site selection;ISS : nuclear mRNA splicing, via spliceosome;	unknown	unknown
Mhc	1.85	1.75	NAS : skeletal muscle myosin thick filament assembly;	IDA : protein homodimerization activity;IMP : structural constituent of muscle;TAS : structural constituent of muscle;ISS : ATPase activity, coupled;IEA : ATP binding;ISS : microfilament motor activity;	ISS : muscle myosin complex;IDA : striated muscle myosin thick filament;IDA : muscle myosin complex;ISS : myosin complex;IDA : sarcomere;IDA : A band;

Continue sur la page suivante

TABLE 6.16 – Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation *pims^{Ey}* dans l'intestin (suite)

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
l(2)01289	1.92	1.73	IMP : Golgi organization;NAS : mitotic spindle organization;IMP : centrosome separation;IDA : plus-end directed microtubule sliding;IGI : mitotic centrosome separation;IDA : protein homotrimerization;IDA : microtubule bundle formation;IMP : cell cycle;	ISS : protein disulfide isomerase activity;	ISS : plasma membrane;
Mbs	1.80	1.72	unknown	NAS : myosin binding;IMP : myosin phosphatase activity;ISS : myosin binding;NAS : myosin phosphatase activity;ISS : myosin phosphatase activity;	ISS : myosin phosphatase complex;NAS : myosin phosphatase complex;
Mf	1.72	1.71	IEA : transmembrane transport;ISS : drug transport;	ND	IDA : A band;
wgn	1.87	1.71	IGI : cell surface receptor linked signaling pathway;NAS : apoptosis;	ISS : tumor necrosis factor receptor activity;NAS : tumor necrosis factor receptor activity;IPI : protein binding;	IDA : integral to plasma membrane;ISS : integral to plasma membrane;
CG3191	1.59	1.67	IEA : transport;	IEA : transporter activity;	IEA : intracellular;
Pif1B	1.90	1.67	ND	IPI : protein binding;	ND
CG32634-RA	1.81	1.62	unknown	unknown	unknown
CG7180	1.75	1.59	IEA : proteolysis;	ISS : protein tyrosine phosphatase activity	ND
AR-2	1.72	1.55	ISS : G-protein coupled receptor protein signaling pathway;	ISS : G-protein coupled receptor activity;ISS : neuropeptide receptor activity;IEA : neuropeptide Y receptor activity;ISS : allatostatin receptor activity;	ISS : integral to membrane;
CG17549	1.65	1.52	unknown	unknown	unknown
Prm	1.66	1.90	IEP : mesoderm development;IMP : myofibril assembly;	ISS : structural constituent of muscle;IEA : motor activity;NAS : structural constituent of muscle;NAS : motor activity;	NAS : striated muscle myosin thick filament;IEA : myosin complex

TABLE 6.16 – Liste des gènes induits par la présence de la flore et réprimés par la mutation *pims^{Ey}* dans l'intestin

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant *pims^{Ey}* par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" ou "unknown" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Gène	Flore	Génotype	GO BP	GO MF	GO CC
Cp15	12.14	8.77	Métabolisme de la chitine	Composant du chorion	Chorion
CG32594	2.40	3.38	Mémoire à long-terme	ND	ND
CG13946	1.98	1.95	ND	ND	ND
unk	1.69	1.67	Processus développementaux	Facteur de transcription à doigts de Zinc	Cytoplasme
CG13565	1.74	1.66	ND	ND	ND

TABLE 6.17 – Liste des gènes réprimés par la présence de la flore et induits par la mutation *pims^{Ey}* dans l'intestin.

Les gènes présentés ici répondent aux deux facteurs à la fois. La colonne "Flore" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène en réponse à la présence de la flore. La colonne "Génotype" indique le taux d'activation moyen de l'expression du gène dans le mutant *pims^{Ey}* par rapport au sauvage. Les colonnes "GO BP", "GO MF" et "GO CC" indiquent s'il y a un terme de Gene Ontology de type Processus Biologique, Fonction Moléculaire ou Composant Cellulaire respectivement qui soit associé au gène considéré, et précise lequel le cas échéant ("ND" signifie qu'aucun terme n'est attribué).

Référence	Description	Enrichissement	p-value
Induits dans l'intestin par la mutation <i>pims^{Ey}</i>			
GO :0045087	innate immune response	15.75	4.38E-03
GO :0045087	innate immune response	16.50	4.44E-03
Induits dans la mouche entière par la présence de la flore			
GO :0008152	metabolic process	1.77	2.62E-05
GO :0044238	primary metabolic process	1.91	1.91E-04
GO :0006508	proteolysis	4.56	1.79E-04
GO :0005975	carbohydrate metabolic process	6.05	9.36E-04
Réprimés dans l'intestin par la présence de la flore			
GO :0050896	response to stimulus	3.39	1.83E-05
GO :0007275	multicellular organismal development	2.52	1.98E-05
GO :0032502	developmental process	2.33	4.74E-05
GO :0048731	system development	2.91	4.14E-05
GO :0007610	behavior	5.55	3.53E-05
GO :0042221	response to chemical stimulus	6.00	3.76E-05
GO :0048856	anatomical structure development	2.62	4.81E-05
GO :0050789	regulation of biological process	2.18	8.53E-05
GO :0009653	anatomical structure morphogenesis	2.90	1.79E-04
GO :0065007	biological regulation	2.05	1.78E-04
GO :0048522	positive regulation of cellular process	6.12	1.87E-04
GO :0009725	response to hormone stimulus	22.13	4.39E-04
GO :0009719	response to endogenous stimulus	22.13	4.39E-04
GO :0048518	positive regulation of biological process	5.47	4.69E-04
GO :0032501	multicellular organismal process	1.94	5.00E-04
GO :0050794	regulation of cellular process	2.13	4.72E-04
GO :0048513	organ development	2.77	1.52E-03
GO :0007417	central nervous system development	7.00	1.64E-03
GO :0040008	regulation of growth	10.78	1.84E-03
GO :0009886	post-embryonic morphogenesis	4.94	2.28E-03
GO :0007435	salivary gland morphogenesis	9.74	2.93E-03
GO :0022612	gland morphogenesis	9.74	2.93E-03
GO :0009888	tissue development	4.29	2.81E-03
GO :0016199	axon midline choice point recognition	42.30	3.83E-03
GO :0010033	response to organic substance	9.10	3.72E-03
GO :0007626	locomotory behavior	7.01	4.13E-03
GO :0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	8.81	4.09E-03
GO :0016043	cellular component organization	2.15	4.89E-03
GO :0009605	response to external stimulus	6.51	5.83E-03
GO :0035272	exocrine system development	7.99	6.25E-03
GO :0007431	salivary gland development	7.99	6.25E-03
GO :0002165	instar larval or pupal development	4.17	6.09E-03
GO :0060255	regulation of macromolecule metabolic process	2.59	6.29E-03
GO :0008038	neuron recognition	16.19	6.33E-03
GO :0016198	axon choice point recognition	31.73	6.45E-03
GO :0008037	cell recognition	15.86	6.43E-03
GO :0007399	nervous system development	3.18	6.40E-03
GO :0009791	post-embryonic development	4.02	6.84E-03
GO :0051239	regulation of multicellular organismal process	5.03	7.74E-03
GO :0007552	metamorphosis	4.38	7.80E-03
GO :0012501	programmed cell death	7.26	7.75E-03
GO :0006333	chromatin assembly or disassembly	13.91	9.03E-03
GO :0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	6.94	9.35E-03
GO :0008219	cell death	6.85	9.74E-03
GO :0030154	cell differentiation	2.54	9.53E-03
GO :0016265	death	6.81	9.60E-03
GO :0048732	gland development	6.81	9.60E-03

TABLE 6.18 – Résultats issus de l'analyse DAVID

Seuls les résultats pour lesquels les valeurs corrigées de p-value sont inférieures à 0.01 sont montrés. Les analyses dans DAVID ont été faites en utilisant les noms des amorces de la puce Affymetrix. La colonne "Référence" indique la référence du terme de Gene Ontology, et la colonne "Description" en donne une brève description. La colonne "Enrichissement" rapporte le taux d'enrichissement du terme dans la liste de d'amorces affymétrie (gènes) par rapport à l'ensemble des amorces présentes sur la puce. Les valeurs corrigées par la méthode de Benjamini-Hochberg de la p-value sont indiquées dans la colonne "p-value".

Up pims guts		SelexConsensus Rel		MF0003		SelexConsensus dl-B		MA0101		M00774-V- NFKB_Q6_01		Number of PWMs	Best ranking	Average
		cbust	swan	cbust	swan	cbust	swan	cbust	swan	cbust	swan			
G_identif	names	3,96	5,81	3,14	5,35	3,30	4,67	-	4,56	2,70	3,95			
CG30263	CG30263	956	588	807	398	774	217	-	320	135	331	9	135	503
CG14704	PGRP-LB	3	3	39	42	9	13	-	-	28	172	8	3	39
CG5411	Pde8	4	134	42	346	52	335	-	-	960	139	8	4	252
CG10570	CG10570	465	742	799	407	210	268	-	-	183	-	7	183	439
CG16844	IM3	-	729	-	44	-	44	-	83	317	82	6	44	217
CG7225	wbl	-	-	228	898	380	-	-	342	222	404	6	222	412
CG15231	IM4	-	-	-	29	-	71	-	13	416	9	5	9	108
CG18106	IM2	-	-	-	68	-	504	-	17	791	135	5	17	303
CG4267	CG4267	-	597	-	143	-	64	-	99	-	512	5	64	283
CG13335	CG13335	-	99	-	667	-	668	-	511	-	783	5	99	546
CG15044	CG15044	-	-	-	818	944	699	-	358	-	337	5	337	631
CG10794	DptB	16	2	-	553	-	297	-	-	-	-	4	2	217
CG13905	CG13905	57	-	26	-	44	-	-	-	636	-	4	26	191
CG3870	chrw	-	-	-	107	-	283	-	109	-	161	4	107	165
CG9812	CG9812	-	-	-	300	-	313	-	195	-	740	4	195	387
CG13482	CG13482	536	900	902	-	-	-	-	-	658	-	4	536	749
CG30154	CG30154	-	77	-	236	-	528	-	-	-	-	3	77	280
CG7629	Attd	508	158	-	860	-	-	-	-	-	-	3	158	509
CG4437	PGRP-LF	-	224	-	344	-	600	-	-	-	-	3	224	389
CG7850	puc	-	-	901	673	-	-	-	-	749	-	3	673	774
CG4432	PGRP-LC	-	30	-	-	-	-	-	-	-	750	2	30	390
CG32185	CG32185	668	332	-	-	-	-	-	-	-	-	2	332	500
CG10910	CG10910	-	-	-	487	-	-	-	653	-	-	2	487	570
CG13325	CG13325	-	-	596	-	-	-	-	-	-	-	1	596	596
CG7402	CG7402	-	732	-	-	-	-	-	-	-	-	1	732	732
CG5550	CG5550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	758	1	758	758
CG16775	CG16775	-	772	-	-	-	-	-	-	-	-	1	772	772
CG16995	CG16995	-	905	-	-	-	-	-	-	-	-	1	905	905
CG5489	Atg7	-	-	-	-	-	913	-	-	-	-	1	913	913

FIGURE 6.7 – Liste des gènes cibles de Relish prédites par CisTargetX

Les matrices potentiellement reconnues par le facteur de transcription sont indiquées dans la première cellule en haut des colonnes. Deux algorithmes existent pour effectuer les calculs du logiciel : Cbust et SWAN, et les résultats sont donnés pour chacun (Cbust en jaune, SWAN en orange). Plus le score d'enrichissement ("enrichment score") d'une matrice est élevé, plus elle est pertinente par rapport à la liste totale des gènes. Les trois dernières colonnes indiquent, pour chaque gène, le nombre total de fois où les calculs du logiciel avec les différentes matrices et les différents algorithmes l'ont sélectionné ("Number of PWM") ; le meilleur rang obtenu parmi les différents calculs effectués ("Best ranking") ; et la moyenne des rangs obtenus pour tous les calculs effectués ("average rank").

gene name	PWM iupac algorithm enrichment score	M00462-V- GATA6 -GATW-		ATCTNATC		CTTATCG		CTTATCA		PF0131		ATCTTATC		M00278-V- LMO2COM MGATATNSG		M00789-V- GATA -GATAR-		M00203-V- GATA -NGATAA-		Number of PWM	Best ranking	average rank
		Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN			
CG10278	GATAE	3	127	422	2	2	2	-	942	14	56	6	8	3	25	4	352	120	239	17	2	137
CG8695	Lvpl	77	30	424	281	334	50	228	253	-	208	411	376	-	171	390	186	-	-	14	30	244
CG14704	PGRP-LB	477	-	-	-	417	560	841	970	321	-	249	314	120	550	433	437	-	751	13	120	495
CG8693	CG8693	78	29	-	279	335	49	229	252	-	207	412	375	-	170	391	184	-	-	13	29	230
CG10806	Nha1	325	-	336	-	172	677	845	-	169	529	284	845	845	-	969	-	-	-	11	169	545
CG5246	CG5246	-	28	4	-	760	288	-	433	-	500	-	-	202	24	288	36	-	109	11	4	243
CG8997	CG8997	95	65	758	493	-	-	573	-	73	297	-	-	-	-	408	492	573	292	11	65	374
CG14500	CG14500	-	488	-	-	-	669	293	112	984	267	-	-	-	-	660	265	825	589	10	112	515
CG10827	CG10827	-	-	99	180	48	39	-	-	106	372	130	157	194	250	-	-	-	-	10	39	158
CG15170	CG15170	505	296	-	-	-	-	179	99	-	-	-	-	439	267	475	848	112	35	10	35	326
CG9527	CG9527	-	-	-	549	530	534	-	-	855	578	263	257	-	635	-	318	-	-	9	257	502
CG33192	MtnD	933	-	-	-	-	-	145	470	206	-	346	664	-	-	166	-	35	337	9	35	367
CG6467	Jon65Aiv	-	362	-	19	-	-	-	-	931	283	255	111	-	336	-	457	-	316	9	19	341
CG31463	CG31463	863	335	739	-	647	403	-	-	-	981	-	-	518	175	-	939	-	-	9	175	622
CG4563	CG4563	-	-	-	-	-	-	-	31	-	722	-	-	544	731	165	413	355	255	8	31	402
CG4563	CG4563	-	-	-	-	-	-	-	31	-	722	-	-	544	731	165	413	355	255	8	31	402
CG9673	CG9673	-	268	5	4	73	24	-	-	-	773	445	263	-	-	-	-	-	-	8	4	232
CG13492	CG13492	97	8	-	681	-	-	-	702	-	815	-	-	585	783	-	226	-	-	8	8	487
CG17633	CG17633	-	317	-	-	-	315	-	618	-	435	-	-	-	-	463	-	705	-	7	315	516
CG33265	Muc68E	-	-	732	205	-	-	-	645	-	115	530	118	-	-	-	279	-	-	7	115	375
CG4653	CG4653	-	267	-	3	74	23	-	-	-	772	446	262	-	-	-	-	-	-	7	3	264
CG8523	Mdr50	-	630	-	3	-	-	507	852	-	404	-	-	-	271	-	-	-	259	6	259	487
CG10911	CG10911	-	617	-	-	-	793	-	733	-	677	-	-	-	-	555	179	-	-	6	179	592
CG3106	CG3106	583	332	-	-	926	859	-	-	407	-	547	-	-	-	-	-	-	-	6	332	609
CG16997	CG16997	-	-	-	-	-	-	-	426	-	312	-	-	-	-	-	319	71	25	5	25	231
CG15254	CG15254	-	-	436	134	-	-	-	-	-	944	440	227	-	-	-	-	-	-	5	134	436
CG17348	drl	132	-	510	-	-	-	739	-	-	-	-	-	715	-	77	-	-	-	5	77	435
CG9092	Gal	727	538	-	-	556	732	-	-	-	-	-	-	715	-	940	-	-	-	5	538	699
CG16965	CG16965	-	900	-	-	-	-	260	893	713	-	811	-	-	-	-	-	-	-	5	260	715
CG5550	CG5550	661	-	-	780	-	-	-	-	849	-	-	-	-	-	762	-	519	-	5	519	714
CG8871	Jon25Biii	-	-	-	192	-	-	-	-	-	257	-	290	-	818	-	890	-	-	5	192	489
CG10062	CG10062	-	519	-	353	-	379	-	-	-	390	-	-	-	-	-	-	-	985	5	353	525
CG13095	Bace	-	-	968	405	-	746	-	-	-	-	439	477	-	-	-	-	-	-	5	405	607
CG12813	Npc2d	-	-	738	230	-	-	-	-	-	-	789	894	-	-	-	-	-	-	4	230	663
CG18030	Jon99Fi	-	-	-	-	-	-	-	50	-	211	-	-	-	-	-	479	-	487	4	50	307
CG6298	Jon74E	-	413	-	-	-	-	-	-	-	672	-	-	-	-	-	406	-	445	4	406	484
CG7542	CG7542	-	412	-	-	-	-	-	-	-	670	-	-	-	-	-	405	-	444	4	405	483
CG12385	thetaTry	-	499	-	528	-	-	-	-	-	894	-	-	-	-	-	626	-	-	4	499	637
CG8093	CG8093	-	62	-	-	-	-	-	-	-	727	-	-	-	-	-	462	-	965	4	62	554
CG10592	CG10592	-	133	-	556	-	-	-	-	-	-	-	-	451	-	440	-	-	-	4	133	395
CG5097	MtnC	-	-	-	-	-	-	-	-	635	532	518	-	-	-	-	-	-	-	3	518	562
CG9463	CG9463	-	418	-	-	-	-	-	922	-	-	-	-	-	-	-	849	-	-	3	418	730
CG3734	CG3734	-	-	-	-	483	491	-	-	884	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	483	619
CG4312	MtnB	-	-	-	-	-	-	-	286	-	-	-	-	-	-	-	987	718	-	3	286	664
CG8773	CG8773	-	-	322	186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	744	-	-	-	-	3	186	417
CG10477	CG10477	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	840	519	-	-	-	609	-	-	3	519	656
CG16775	CG16775	-	-	-	590	-	-	-	860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	590	725
CG14120	CG14120	-	-	-	-	-	526	-	-	809	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	526	668
CG11911	CG11911	998	-	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	39	519
CG31783	ninaD	-	677	-	666	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	666	672
CG31343	CG31343	-	800	-	707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	707	754
CG18681	epsilonTry	-	964	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	564	-	-	-	2	564	764
CG8577	PGRP-SC1a /// P	-	-	-	-	-	-	-	-	520	-	-	-	-	827	-	-	-	-	2	520	674
CG15534	CG15534	-	671	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	733	-	-	-	-	2	671	702
CG30043	CG30043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	896	1	896	896
CG8869	Jon25Bii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	782	-	-	1	782	782
CG8774	CG8774	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	671	-	-	-	-	1	671	671
CG4739	Ugt86Dc	-	-	-	-	-	-	-	-	953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	953	953
CG8661	CG8661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	425	-	-	-	-	1	425	425
CG18444	alphaTry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	454	1	454	454
CG15533	CG15533	-	432	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	432	432
CG33523	CG33523	-	-	-	241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	241	241
CG6296	CG6296	-	-	-	497	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	497	497
CG3841	CG3841 /// nmo	973	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	973	973
CG2772	CG2772	-	-	994	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	994	994
CG12374	CG12374	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	644	-	-	-	-	1	644	644
CG16749	CG16749	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	774	-	-	-	-	1	774	774
CG32754	vanin-like	-	-	-	-	-	514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	514	514
CG10475	Jon65Ai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	625	-	-	1	625	625

FIGURE 6.8 – Liste des gènes cibles de GATAe prédites par CisTargetX

Les matrices potentiellement reconnues par le facteur de transcription sont indiquées dans la première cellule en haut des colonnes. Deux algorithmes existent pour effectuer les calculs du logiciel : Cbust et SWAN, et les résultats sont donnés pour chacun (Cbust en jaune, SWAN en orange). Plus le score d'enrichissement ("enrichment score") d'une matrice est élevé, plus elle est pertinente par rapport à la liste totale des gènes. Les trois dernières colonnes indiquent, pour chaque gène, le nombre total de fois où les calculs du logiciel avec les différentes matrices et les différents algorithmes l'ont sélectionné ("Number of PWM") ; le meilleur rang obtenu parmi les différents calculs effectués ("Best ranking") ; et la moyenne des rangs obtenus pour tous les calculs effectués ("average rank").

gene name	PWW iupac algorithm enrichment score	M00462-V- GATA6 -GATW-		ATCTNATC		CTTATCG		CTTATCA		PF0131		ATCTTATC		M00278-V- LMO2COM MGATATNSG		M00789-V- GATA -GATAR-		M00203-V- GATA -NGATAA-		Number of PWM	Best ranking	average rank	
		Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN	Cbust	SWAN				
		3	127	422	2	2	2	-	942	14	56	6	8	3	25	4	352	120	239				
CG10278	GATAE	6,85	8,47	6,82	8,32	5,98	5,91	5,64	3,94	5,01	4,37	4,12	4,93	3,30	4,51	4	171	390	186	-	17	2	137
CG8695	Lvpl	77	30	424	281	334	50	228	253	-	208	411	376	-	171	390	186	-	-	14	30	244	
CG14704	PGRP-LB	477	-	-	-	417	560	841	970	321	-	249	314	120	550	433	437	-	751	13	120	495	
CG8693	CG8693	78	29	-	279	335	49	229	252	-	207	412	375	-	170	391	184	-	-	13	29	230	
CG10806	Nha1	325	-	336	-	172	677	845	-	169	529	284	845	845	-	969	-	-	-	11	169	545	
CG5246	CG5246	-	28	4	-	760	288	-	433	-	500	-	-	202	24	288	36	-	109	11	4	243	
CG8997	CG8997	95	65	758	493	-	-	573	-	73	297	-	-	-	-	408	492	573	292	11	65	374	
CG14500	CG14500	-	488	-	-	-	669	293	112	984	267	-	-	-	-	660	265	825	589	10	112	515	
CG10827	CG10827	-	-	99	180	48	39	-	-	106	372	130	157	194	250	-	-	-	-	10	39	158	
CG15170	CG15170	505	296	-	-	-	-	179	99	-	-	-	-	439	267	475	848	112	35	10	35	326	
CG9527	CG9527	-	-	-	549	530	534	-	-	855	578	263	257	-	635	-	318	-	-	9	257	502	
CG33192	MtnD	933	-	-	-	-	-	145	470	206	-	346	664	-	-	166	-	35	337	9	35	367	
CG6467	Jon65Aiv	-	362	-	19	-	-	-	-	931	283	255	111	-	336	-	457	-	316	9	19	341	
CG31463	CG31463	863	335	739	-	647	403	-	-	-	981	-	-	518	175	-	939	-	-	9	175	622	
CG4563	CG4563	-	-	-	-	-	-	-	31	-	722	-	-	544	731	165	413	355	255	8	31	402	
CG4563	CG4563	-	-	-	-	-	-	-	31	-	722	-	-	544	731	165	413	355	255	8	31	402	
CG9673	CG9673	-	268	5	4	73	24	-	-	-	773	445	263	-	-	-	-	-	-	8	4	232	
CG13492	CG13492	97	8	-	681	-	-	-	702	-	815	-	-	585	783	-	226	-	-	8	8	487	
CG17633	CG17633	-	317	-	-	-	315	-	618	-	435	-	-	-	463	-	705	-	758	7	315	516	
CG33265	Muc68E	-	-	732	205	-	-	-	645	-	115	530	118	-	-	-	279	-	-	7	115	375	
CG4653	CG4653	-	267	-	3	74	23	-	-	-	772	446	262	-	-	-	-	-	-	7	3	264	
CG8523	Mdr50	-	630	-	3	74	23	-	507	852	404	-	-	-	271	-	-	-	259	6	259	487	
CG10911	CG10911	-	617	-	-	-	793	-	733	-	677	-	-	-	-	555	179	-	-	6	179	592	
CG3106	CG3106	583	332	-	-	926	859	-	-	407	-	547	-	-	-	-	-	-	-	6	332	609	
CG16997	CG16997	-	-	-	-	-	-	-	426	-	-	-	-	-	-	-	319	71	25	5	25	231	
CG15254	CG15254	-	-	436	134	-	-	-	-	-	944	440	227	-	-	-	-	-	-	5	134	436	
CG17348	drl	132	-	510	-	-	-	739	-	-	-	-	-	715	-	77	-	-	-	5	77	435	
CG9092	Gal	727	538	-	-	556	732	-	-	-	-	-	-	715	-	940	-	-	-	5	538	699	
CG16965	CG16965	-	900	-	-	-	-	260	893	713	-	811	-	-	-	-	-	-	-	5	260	715	
CG5550	CG5550	661	-	-	780	-	-	-	-	849	-	-	-	-	-	-	762	-	519	5	519	714	
CG8871	Jon25Biii	-	-	-	192	-	-	-	-	-	257	-	290	-	818	-	890	-	-	5	192	489	
CG10062	CG10062	-	519	-	353	-	379	-	-	-	390	-	-	-	-	-	-	-	985	5	353	525	
CG13095	Bace	-	-	968	405	-	746	-	-	-	-	439	477	-	-	-	-	-	-	5	405	607	
CG12813	Npc2d	-	-	738	230	-	-	-	-	-	-	789	894	-	-	-	-	-	-	4	230	663	
CG18030	Jon99Fi	-	-	-	-	-	-	50	-	211	-	-	-	-	-	479	-	487	-	4	50	307	
CG6298	Jon74E	-	413	-	-	-	-	-	-	672	-	-	-	-	-	406	-	445	-	4	406	484	
CG7542	CG7542	-	412	-	-	-	-	-	-	670	-	-	-	-	-	405	-	444	-	4	405	483	
CG12385	thetaTry	-	499	-	528	-	-	-	-	894	-	-	-	-	-	626	-	-	-	4	499	637	
CG8093	CG8093	-	62	-	-	-	-	-	-	727	-	-	-	-	-	462	-	965	-	4	62	554	
CG10592	CG10592	-	133	-	556	-	-	-	-	-	-	-	-	451	-	440	-	-	-	4	133	395	
CG5097	MtnC	-	-	-	-	-	-	-	635	532	518	-	-	-	-	-	-	-	-	3	518	562	
CG9463	CG9463	-	418	-	-	-	-	922	-	-	-	-	-	-	-	-	849	-	-	3	418	730	
CG3734	CG3734	-	-	-	-	483	491	-	-	884	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	483	619	
CG4312	MtnB	-	-	-	-	-	-	286	-	-	-	-	-	-	-	987	718	-	-	3	286	664	
CG8773	CG8773	-	-	322	186	-	-	-	-	-	-	-	-	744	-	-	-	-	-	3	186	417	
CG10477	CG10477	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	840	519	-	-	-	609	-	-	3	519	656	
CG16775	CG16775	-	-	-	590	-	-	860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	590	725	
CG14120	CG14120	-	-	-	-	526	-	-	-	809	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	526	668	
CG11911	CG11911	998	-	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	39	519	
CG31783	ninaD	-	677	-	666	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	666	672	
CG31343	CG31343	-	800	-	707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	707	754	
CG18681	epsilonTry	-	964	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	564	-	-	-	2	564	764	
CG8577	PGRP-SC1a /// P	-	-	-	-	-	-	-	-	520	-	-	-	827	-	-	-	-	-	2	520	674	
CG15534	CG15534	-	671	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	733	-	-	-	-	-	2	671	702	
CG30043	CG30043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	896	-	1	896	896	
CG8869	Jon25Bii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	782	-	-	-	1	782	782	
CG8774	CG8774	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	671	-	-	-	-	-	1	671	671	
CG4739	Ugt86Dc	-	-	-	-	-	-	-	-	953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	953	953	
CG8661	CG8661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	425	-	-	-	-	-	1	425	425	
CG18444	alphaTry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	454	-	1	454	454	
CG15533	CG15533	-	432	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	432	432	
CG33523	CG33523	-	-	-	241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	241	241	
CG6296	CG6296	-	-	-	497	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	497	497	
CG3841	CG3841 /// nmo	973	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	973	973	
CG2772	CG2772	-	-	994	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	994	994	
CG12374	CG12374	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	644	-	-	-	-	-	1	644	644	
CG16749	CG16749	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	774	-	-	-	-	-	1	774	774	
CG32754	vanin-like	-	-	-	-	514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	514	514	
CG10475	Jon65Ai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	625	-	-	-	1	625	625	

FIGURE 6.9 – Liste des gènes cibles de Mad prédites par CisTargetX

Les matrices potentiellement reconnues par le facteur de transcription sont indiquées dans la première cellule en haut des colonnes. Deux algorithmes existent pour effectuer les calculs du logiciel : Cbust et SWAN, et les résultats sont donnés pour chacun (Cbust en jaune, SWAN en orange). Plus le score d'enrichissement ("enrichment score") d'une matrice est élevé, plus elle est pertinente par rapport à la liste totale des gènes. Les trois dernières colonnes indiquent, pour chaque gène, le nombre total de fois où les calculs du logiciel avec les différentes matrices et les différents algorithmes l'ont sélectionné ("Number of PWM") ; le meilleur rang obtenu parmi les différents calculs effectués ("Best ranking") ; et la moyenne des rangs obtenus pour tous les calculs effectués ("average rank").

Bibliographie

- [1] Silvia G Acinas, Luisa A Marcelino, Vanja Klepac-Ceraj, and Martin F Polz. Operonsse-
quencedivergence and redundancy of 16s rRNA. *J Bacteriol*, pages 1–8, Apr 2004.
- [2] M. D Adams. The genome sequence of drosophila melanogaster. *Science*, 287(5461) :2185–
2195, Mar 2000.
- [3] Stein Aerts, Xiao-Jiang Quan, Annelies Claeys, Marina Naval Sanchez, Phillip Tate, Jiekun
Yan, and Bassem A Hassan. Robust target gene discovery through transcriptome pertur-
bations and genome-wide enhancer predictions in drosophila uncovers a regulatory basis
for sensory specification. *Plos Biol*, 8(7) :e1000435, Jan 2010.
- [4] Hervé Agaisse, Laura S Burrack, Jennifer A Philips, Eric J Rubin, Norbert Perrimon,
and Darren E Higgins. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular
bacterial infection. *Science*, 309(5738) :1248–51, Aug 2005.
- [5] S Ahrne, S Nobaek, B Jeppsson, I Adlerberth, AE Wold, and G Molin. The normal
lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. *JournalofAppliedMicrobiology*,
pages 88–94, Jul 1998.
- [6] Idir Akhouayri, Claire Turc, Julien Royet, and Bernard Charroux. Toll-8/tollo negatively
regulates antimicrobial response in the drosophila respiratory epithelium. *PLoS Pathog*,
7(10) :e1002319, Oct 2011.
- [7] Bader Al-Anzi, Elena Armand, Paul Nagamei, Margaret Olszewski, Viveca Sapin, Christo-
pher Waters, Kai Zinn, Robert J Wyman, and Seymour Benzer. The leucokinin pathway
and its neurons regulate meal size in drosophila. *Curr Biol*, 20(11) :969–78, Jun 2010.
- [8] Alla Amcheslavsky, Naoto Ito, Jin Jiang, and Y Tony Ip. Tuberous sclerosis complex and
myc coordinate the growth and division of drosophila intestinal stem cells. *The Journal of
Cell Biology*, 193(4) :695–710, May 2011.
- [9] Alla Amcheslavsky, Jin Jiang, and Y Tony Ip. Tissue damage-induced intestinal stem cell
division in drosophila. *Cell Stem Cell*, 4(1) :49–61, Jan 2009.
- [10] Yiorgos Apidianakis, Chrysoula Pitsouli, Norbert Perrimon, and Laurence Rahme. Synergy
between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proc Natl
Acad Sci USA*, 106(49) :20883–8, Dec 2009.
- [11] Amelie Avet-Rochex, Evelyne Bergeret, Ina Attree, Marie Meister, and Marie-Odile Fau-
varque. Suppression of drosophila cellular immunity by directed expression of the exo-
toxin gap domain of pseudomonas aeruginosa. *Cell Microbiol*, 7(6) :799–810, Jun 2005.
- [12] Amélie Avet-Rochex, Jackie Perrin, Evelyne Bergeret, and Marie-Odile Fauvarque. Rac2
is a major actor of drosophila resistance to pseudomonas aeruginosa acting in phagocytic
cells. *Genes Cells*, 12(10) :1193–204, Oct 2007.
- [13] Priti Azad, Julie Ryu, and Gabriel G Haddad. Distinct role of hsp70 in drosophila hemo-
cytes during severe hypoxia. *Free Radic Biol Med*, 51(2) :530–8, Jul 2011.

- [14] Daniel T Babcock, Amanda R Brock, Greg S Fish, Yan Wang, Laurent Perrin, Mark A Krasnow, and Michael J Galko. Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in drosophila larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(29) :10017–22, Jul 2008.
- [15] Robert S Balaban, Shino Nemoto, and Toren Finkel. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4) :483–95, Feb 2005.
- [16] Thomas Becker, Gerrit Loch, Marc Beyer, Ingo Zinke, Anna C Aschenbrenner, Pilar Carrera, Therese Inhester, Joachim L Schultze, and Michael Hoch. Foxo-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature*, 463(7279) :369–73, Jan 2010.
- [17] Katherine Beebe, Wen-Chih Lee, and Craig A Micchelli. Jak/stat signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the drosophila intestinal stem cell lineage. *Dev Biol*, 338(1) :28–37, Feb 2010.
- [18] Mohammed Benghezal, Marie-Odile Fauvarque, Régis Tournebize, Romain Froquet, Anna Marchetti, Evelyn Bergeret, Bernard Lardy, Gérard Klein, Philippe Sansonetti, Steve J Charette, and Pierre Cosson. Specific host genes required for the killing of klebsiella bacteria by phagocytes. *Cell Microbiol*, 8(1) :139–48, Jan 2006.
- [19] Yoav Benjamini and Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate : A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, 57(1) :289–300, Aug 1995.
- [20] Sumit Bhattacharyya, Pradeep K Dudeja, and Joanne K Tobacman. Ros, hsp27, and ikkbeta mediate dextran sodium sulfate (dss) activation of ikappaba, nfkappab, and il-8. *Inflamm Bowel Dis*, 15(5) :673–683, May 2009.
- [21] Gawa Bidla, Malin Lindgren, Ulrich Theopold, and Mitchell S Dushay. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in drosophila larvae. *Dev Comp Immunol*, 29(8) :669–79, Jan 2005.
- [22] Floris J Bikker, Wendy E Kaman-Van Zanten, Anne-Marij B C de Vries-van de Ruit, Ingrid Voskamp-Visser, Peter A V van Hooft, Roos H Mars-Groenendijk, Peter C De Visser, and Daan Noort. Evaluation of the antibacterial spectrum of drosocin analogues. *Chem Biol Drug Des*, 68(3) :148–53, Sep 2006.
- [23] Vincent Bischoff, Cécile Vignal, Ivo G Boneca, Tatiana Michel, Jules A Hoffmann, and Julien Royet. Function of the drosophila pattern-recognition receptor pgrp-sd in the detection of gram-positive bacteria. *Nat Immunol*, 5(11) :1175–80, Nov 2004.
- [24] Vincent Bischoff, Cécile Vignal, Bernard Duvic, Ivo G Boneca, Jules A Hoffmann, and Julien Royet. Downregulation of the drosophila immune response by peptidoglycan-recognition proteins sc1 and sc2. *PLoS Pathog*, 2(2) :e14, Feb 2006.
- [25] Benoît Biteau, Jason Karpac, Stephen Supoyo, Matthew Degennaro, Ruth Lehmann, and Heinrich Jasper. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in drosophila. *PLoS Genet*, 6(10) :e1001159, Oct 2010.
- [26] Stéphanie Blandin and Elena A Levashina. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular Immunology*, 2004.
- [27] Gary M Bokoch. Regulation of innate immunity by rho gtpases. *Trends Cell Biol*, 15(3) :163–71, Mar 2005.
- [28] MINDY M BRASHEARS, ALEJANDRO AMEZQUITA, and DIVYA JARONI. Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. *ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH*, 50 :1–31, Oct 2005.

- [29] A Braun, J A Hoffmann, and M Meister. Analysis of the drosophila host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(24) :14337–42, Nov 1998.
- [30] Catherine A Brennan, Joseph R Delaney, David S Schneider, and Kathryn V Anderson. Psidin is required in drosophila blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr Biol*, 17(1) :67–72, Jan 2007.
- [31] Catherine A Brennan, Joseph R Delaney, David S Schneider, and Kathryn V Anderson. Psidin is required in drosophila blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body som. *Curr Biol*, pages 1–1, Jul 2007.
- [32] Ted Brummel, Alisa Ching, Laurent Seroude, Anne F Simon, and Seymour Benzer. Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(35) :12974–9, Aug 2004.
- [33] Nicolas Buchon, Nichole A Broderick, Sveta Chakrabarti, and et al. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in drosophila. *Genes & Development*, pages 1–13, Sep 2009.
- [34] Nicolas Buchon, Nichole A Broderick, Takayuki Kuraishi, and Bruno Lemaitre. Drosophila egfr pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*, 8 :152, Jan 2010.
- [35] Nicolas Buchon, Nichole A Broderick, Mickael Poidevin, Sylvain Pradervand, and Bruno Lemaitre. Drosophila intestinal response to bacterial infection : activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe*, 5(2) :200–11, Feb 2009.
- [36] P Bulet, C Hetru, J L Dimarcq, and D Hoffmann. Antimicrobial peptides in insects ; structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23(4-5) :329–44, Jan 1999.
- [37] Philippe Bulet and Reto Stöcklin. Insect antimicrobial peptides : structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*, 12(1) :3–11, Jan 2005.
- [38] Pablo Cabrero, Jonathan C Radford, Kate E Broderick, Laurence Costes, Jan A Veenstra, Eric P Spana, Shireen A Davies, and Julian A T Dow. The dh gene of drosophila melanogaster encodes a diuretic peptide that acts through cyclic amp. *Journal of Experimental Biology*, pages 1–9, Nov 2002.
- [39] Y Carton, A J Nappi, and M Poirie. Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Dev Comp Immunol*, 29(1) :9–32, Jan 2005.
- [40] Gil B Carvalho, Pankaj Kapahi, David J Anderson, and Seymour Benzer. Allocrine modulation of feeding behavior by the sex peptide of drosophila. *Curr Biol*, 16(7) :692–6, Apr 2006.
- [41] Laure El Chamy, Vincent Leclerc, Isabelle Caldelari, and Jean-Marc Reichhart. Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of toll. *Nat Immunol*, 9(10) :1165–70, Oct 2008.
- [42] James Angus Chandler, Jenna Morgan Lang, Srijak Bhatnagar, Jonathan A Eisen, and Artyom Kopp. Bacterial communities of diverse drosophila species : ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genet*, 7(9) :e1002272, Sep 2011.
- [43] Bernard Charroux, Thomas Rival, Karine Narbonne-Reveau, and Julien Royet. Bacterial detection by drosophila peptidoglycan recognition proteins. *Institut Pasteur*, pages 1–6, Apr 2009.
- [44] Bernard Charroux and Julien Royet. Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the drosophila immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(24) :9797–802, Jun 2009.

- [45] Venkateswara R Chintapalli, Jing Wang, and Julian A T Dow. Using flyatlas to identify better drosophila melanogaster models of human disease. *Nat Genet*, 39(6) :715–20, Jun 2007.
- [46] Kwang-Min Choe, Hyangkyu Lee, and Kathryn V Anderson. Drosophila peptidoglycan recognition protein lc (pgrp-lc) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(4) :1122–6, Jan 2005.
- [47] Kwang-Min Choe, Thomas Werner, Svenja Stöven, Dan Hultmark, and Kathryn V Anderson. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (pgrp) in relish activation and antibacterial immune responses in drosophila. *Science*, 296(5566) :359–62, Apr 2002.
- [48] Na-Hyun Choi, Joong-Gook Kim, Dong-Jin Yang, Young-Shin Kim, and Mi-Ae Yoo. Age-related changes in drosophila midgut are associated with pvf2, a pdgf/vegf-like growth factor. *Aging Cell*, 7(3) :318–34, Jun 2008.
- [49] Na Hyun Choi, Elena Lucchetta, and Benjamin Ohlstein. Nonautonomous regulation of drosophila midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(46) :18702–7, Nov 2011.
- [50] D J Clancy, D Gems, L G Harshman, S Oldham, H Stocker, E Hafen, S J Leivers, and L Partridge. Extension of life-span by loss of chico, a drosophila insulin receptor substrate protein. *Science*, 292(5514) :104–6, Apr 2001.
- [51] Michael E Clark, Cort L Anderson, Jessica Cande, and Timothy L Karr. Widespread prevalence of wolbachia in laboratory stocks and the implications for drosophila research. *Genetics*, 170(4) :1667–75, Aug 2005.
- [52] GEOFFREY M COAST, SIMON G WEBSTER, KATHLEEN M SCHEGG, STEPHEN S TOBE, and DAVID A SCHOOLEY. The drosophila melanogasterhomologue of an insect calcitonin- like diuretic peptide stimulates v-atpase activity in fruit fly malpighian tubules. *Journal of Experimental Biology*, pages 1–10, Apr 2001.
- [53] Tom Coenye and Peter Vandamme. Intragenomic heterogeneity between multiple 16s ribosomal rna operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters*, 228(1) :45–9, Nov 2003.
- [54] Paola Cognigni, Andrew P Bailey, and Irene Miguel-Aliaga. Enteric neurons and systemic signals couple nutritional and reproductive status with intestinal homeostasis. *Cell Metab*, 13(1) :92–104, Jan 2011.
- [55] C T Collier, M R Smiricky-Tjardes, D M Albin, J E Wubben, V M Gabert, Deplancke, D Bane, D B Anderson, and H R Gaskins. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *Journal of Animal Science*, 81 :3035–3045, Nov 2003.
- [56] ROBERT K COLWELL and JONATHAN A CODDINGTON. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. pages 101–118, Nov 1994.
- [57] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011) :931–45, Oct 2004.
- [58] H S Cooper, S N Murthy, R S Shah, and D J Sedergran. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 69(2) :238–49, Aug 1993.
- [59] Vanessa Corby-Harris, Ana Clara Pontaroli, Lawrence J Shimkets, Jeffrey L Bennetzen, Kristin E Habel, and Daniel E L Promislow. Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of drosophila melanogaster. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11) :3470–9, Jun 2007.

- [60] Julia B Cordero, Juan P Macagno, Rhoda K Stefanatos, Karen E Strathdee, Ross L Cagan, and Marcos Vidal. Oncogenic ras diverts a host tn timer suppressor activity into tumor promoter. *Developmental Cell*, 18(6) :999–1011, Jun 2010.
- [61] Christopher R Cox and Michael S Gilmore. Native microbial colonization of drosophila melanogaster and its use as a model of enterococcus faecalis pathogenesis. *Infection and Immunity*, 75(4) :1565–76, Apr 2007.
- [62] Michèle Crozatier and Marie Meister. Drosophila haematopoiesis. *Cell Microbiol*, 9(5) :1117–26, May 2007.
- [63] Michèle Crozatier, Jean-Michel Ubeda, Alain Vincent, and Marie Meister. Cellular immune response to parasitization in drosophila requires the ebf orthologue collier. *Plos Biol*, 2(8) :E196, Aug 2004.
- [64] S Daffre, P Kylsten, C Samakovlis, and D Hultmark. The lysozyme locus in drosophila melanogaster : an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet*, 242(2) :152–62, Jan 1994.
- [65] Justin R DiAngelo, Michelle L Bland, Shelly Bambina, Sara Cherry, and Morris J Birnbaum. The immune response attenuates growth and nutrient storage in drosophila by reducing insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(49) :20853–8, Dec 2009.
- [66] Pascale F Dijkers and Patrick H O’Farrell. Drosophila calcineurin promotes induction of innate immune responses. *Curr Biol*, 17(23) :2087–93, Dec 2007.
- [67] JEAN-LUC DIMARCQ, JEAN-LUC IMLER, RENE LANOT, R ALAN B EZEKOWITZ, Jules A Hoffmann, CHARLES A JANEWAY, and MARIE LAGUEUX. Treatment of l(2)mbn drosophila tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *insect Biochem Molec Biol*, pages 1–10, Feb 1997.
- [68] Ronald R Dubreuil. Copper cells and stomach acid secretion in the drosophila midgut. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(5) :745–52, May 2004.
- [69] Paul B Eckburg, Elisabeth M Bik, Charles N Bernstein, Elizabeth Purdom, Les Dethlefsen, Michael Sargent, Steven R Gill, Karen E Nelson, and David A Relman. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728) :1635–8, Jun 2005.
- [70] M Elrod-Erickson, S Mishra, and D Schneider. Interactions between the cellular and humoral immune responses in drosophila. *Curr Biol*, 10(13) :781–4, Jun 2000.
- [71] Philipp Engel, Vincent G Martinson, and Nancy A Moran. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(27) :11002–7, Jul 2012.
- [72] Iwan R Evans, Nan Hu, Helen Skaer, and Will Wood. Interdependence of macrophage migration and ventral nerve cord development in drosophila embryos. *Development*, 137(10) :1625–33, May 2010.
- [73] Christina Falschlehner and Michael Boutros. Innate immunity : regulation of caspases by iap-dependent ubiquitylation. *EMBO J*, 31(12) :2750–2, Jun 2012.
- [74] Karoline Faust, J Fah Sathirapongsasuti, Jacques Izard, Nicola Segata, Dirk Gevers, Jeroen Raes, and Curtis Huttenhower. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol*, 8(7) :e1002606, Jul 2012.
- [75] Marie-Odile Fauvarque and Michael J Williams. Drosophila cellular immunity : a story of migration and adhesion. *J Cell Sci*, 124(Pt 9) :1373–82, May 2011.

- [76] D Ferrandon, A C Jung, M Cricqui, B Lemaitre, S Uttenweiler-Joseph, L Michaut, J Reichhart, and J A Hoffmann. 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, Aug 1998.
- [77] L I FESSLER, R E NELSON, and J H FESSLER. Drosophila extracellular matrix. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 245 :1–24, Jul 1994.
- [78] Sergio R Filipe, Alexander Tomasz, and Petros Ligoxygakis. Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the drosophila toll pathway. *EMBO reports*, 6(4) :327–33, Apr 2005.
- [79] Edan Foley and Patrick H O’Farrell. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in drosophila. *Genes & Development*, 17(1) :115–25, Jan 2003.
- [80] N. C Franc, Pascal Heitzler, R ALAN B EZEKOWITZ, and Kristin White. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in drosophila. *Science*, 284(5422) :1991–1994, Jun 1999.
- [81] Michael J Galko and Mark A Krasnow. Cellular and genetic analysis of wound healing in drosophila larvae. *Plos Biol*, 2(8) :E239, Aug 2004.
- [82] Mathilde Gendrin, David P Welchman, Mickael Poidevin, Mireille Hervé, and Bruno Lemaitre. Long-range activation of systemic immunity through peptidoglycan diffusion in drosophila. *PLoS Pathog*, 5(12) :e1000694, Dec 2009.
- [83] Steven R Gill, Mihai Pop, Robert T Deboy, Paul B Eckburg, Peter J Turnbaugh, Buck S Samuel, Jeffrey I Gordon, David A Relman, Claire M Fraser-Liggett, and Karen E Nelson. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778) :1355–9, Jun 2006.
- [84] Eliezer Gilsohn and Talila Volk. Slowdown promotes muscle integrity by modulating integrin-mediated adhesion at the myotendinous junction. *Development*, 137(5) :785–94, Mar 2010.
- [85] Bernadette M Glasheen, Renée M Robbins, Caitlin Piette, Greg J Beitel, and Andrea Page-Mccaw. A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in drosophila. *Dev Biol*, 344(2) :772–83, Aug 2010.
- [86] Vanessa Gobert, Marie Gottar, Alexey A Matskevich, Sophie Rutschmann, Julien Royet, Marcia Belvin, Jules A Hoffmann, and Dominique Ferrandon. Dual activation of the drosophila toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*, 302(5653) :2126–30, Dec 2003.
- [87] Akira Goto, Tatsuhiko Kadowaki, and Yasuo Kitagawa. Drosophila hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol*, 264 :582–591, Nov 2003.
- [88] Marie Gottar, Vanessa Gobert, Alexey A Matskevich, Jean-Marc Reichhart, Chengshu Wang, Tariq M Butt, Marcia Belvin, Jules A Hoffmann, and Dominique Ferrandon. Dual detection of fungal infections in drosophila via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, 127(7) :1425–37, Dec 2006.
- [89] Marie Gottar, Vanessa Gobert, Tatiana Michel, Marcia Belvin, Geoffrey Duyk, Jules A Hoffmann, Dominique Ferrandon, and Julien Royet. The drosophila immune response against gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881) :640–4, Apr 2002.

- [90] Ennio De Gregorio, Sung-Jun Han, Won-Jae Lee, Min-Ji Baek, Tsukasa Osaki, Shun ichiro Kawabata, Bok-Leul Lee, Sadaaki Iwanaga, Bruno Lemaitre, and Paul T Brey. An immune-responsive serpin regulates the melanization cascade in drosophila. *Developmental Cell*, 3(4) :581–92, Oct 2002.
- [91] Ennio De Gregorio, Paul T Spellman, Phoebe Tzou, Gerald M Rubin, and Bruno Lemaitre. The toll and imd pathways are the major regulators of the immune response in drosophila. *EMBO J*, 21(11) :2568–79, Jun 2002.
- [92] Eun-Mi Ha, Kyung-Ah Lee, Seon Hwa Park, Sung-Hee Kim, Hyuck-Jin Nam, Hyo-Young Lee, Dongmin Kang, and Won-Jae Lee. Regulation of duox by the galphaq-phospholipase cbeta-ca2+ pathway in drosophila gut immunity. *Developmental Cell*, 16(3) :386–97, Mar 2009.
- [93] Eun-Mi Ha, Kyung-Ah Lee, You Yeong Seo, Sung-Hee Kim, Jae-Hong Lim, Byung-Ha Oh, Jaesang Kim, and Won-Jae Lee. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nat Immunol*, 10(9) :949–57, Sep 2009.
- [94] Eun-Mi Ha, Chun-Taek Oh, Yun Soo Bae, and Won-Jae Lee. A direct role for dual oxidase in drosophila gut immunity. *Science*, 310(5749) :847–50, Nov 2005.
- [95] Eleanor R Haine, Yannick Moret, Michael T Siva-Jothy, and Jens Rolff. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. *Science*, 322 :1–3, Nov 2008.
- [96] S-H Han, J-H Ryu, C-T Oh, K-B Nam, H-J Nam, I-H Jang, P T Brey, and W-J Lee. The moleskin gene product is essential for caudal-mediated constitutive antifungal drosomycin gene expression in drosophila epithelia. *Insect Mol Biol*, 13(3) :323–7, Jun 2004.
- [97] Yumi Hashimoto, Yukichika Tabuchi, Kenji Sakurai, Mayumi Kutsuna, Kenji Kurokawa, Takeshi Awasaki, Kazuhisa Sekimizu, Yoshinobu Nakanishi, and Akiko Shiratsuchi. Identification of lipoteichoic acid as a ligand for draper in the phagocytosis of staphylococcus aureus by drosophila hemocytes. *J Immunol*, 183(11) :7451–60, Dec 2009.
- [98] Lauren M Hedges, Jeremy C Brownlie, Scott L O’Neill, and Karyn N Johnson. Wolbachia and virus protection in insects. *Science*, 322(5902) :702, Oct 2008.
- [99] Dwayne Hegedus, Martin Erlandson, Cedric Gillott, and Umut Toprak. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 54 :285–302, Jan 2009.
- [100] Jan-Hendrik Hehemann, Gaëlle Correc, Tristan Barbeyron, William Helbert, Mirjam Czek, and Gurvan Michel. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290) :908–12, Apr 2010.
- [101] Anne Christina Hergarden, Timothy D Tayler, and David J Anderson. Allatostatin-a neurons inhibit feeding behavior in adult drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(10) :3967–72, Mar 2012.
- [102] Anne Holz, Barbara Bossinger, Thomas Strasser, Wilfried Janning, and Robert Klapper. The two origins of hemocytes in drosophila. *Development*, 130(20) :4955–62, Oct 2003.
- [103] Viktor Honti, Gábor Csordás, Róbert Márkus, Eva Kurucz, Ferenc Jankovics, and István Andó. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in drosophila melanogaster. *Mol Immunol*, 47(11-12) :1997–2004, Jul 2010.
- [104] Da Wei Huang, Brad T Sherman, and Richard A Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1) :44–57, Jan 2009.

- [105] J B Hughes, J J Hellmann, T H Ricketts, and B J Bohannon. Counting the uncoun-
table : statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental
Microbiology*, 67(10) :4399–406, Oct 2001.
- [106] J P Hugot, M Chamailard, H Zouali, S Lesage, J P Cézard, J Belaiche, S Almer, C Tysk,
C A O’Morain, M Gassull, V Binder, Y Finkel, A Cortot, R Modigliani, P Laurent-
Puig, C Gower-Rousseau, J Macry, J F Colombel, M Sahbatou, and G Thomas. Asso-
ciation of nod2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to crohn’s disease. *Nature*,
411(6837) :599–603, May 2001.
- [107] D Hultmark. Insect lysozymes. *EXS*, 75 :87–102, Jan 1996.
- [108] William W Ja, Gil B Carvalho, Elizabeth M Mak, Noelle N de la Rosa, Annie Y Fang,
Jonathan C Liong, Ted Brummel, and Seymour Benzer. Prandiology of drosophila and the
cafe assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(20) :8253–6, May 2007.
- [109] Huaqi Jiang and Bruce A Edgar. Egfr signaling regulates the proliferation of drosophila
adult midgut progenitors. *Development*, 136(3) :483–93, Feb 2009.
- [110] Huaqi Jiang and Bruce A Edgar. Intestinal stem cells in the adult drosophila midgut.
Experimental Cell Research, 317(19) :2780–8, Nov 2011.
- [111] Huaqi Jiang and Bruce A Edgar. Intestinal stem cell function in drosophila and mice.
Current Opinion in Genetics & Development, May 2012.
- [112] Huaqi Jiang, Marc O Grenley, Maria-Jose Bravo, Rachel Z Blumhagen, and Bruce A Edgar.
Egfr/ras/mapk signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in
drosophila. *Cell Stem Cell*, 8(1) :84–95, Jan 2011.
- [113] Huaqi Jiang, Parthiv H Patel, Alexander Kohlmaier, Marc O Grenley, Donald G Mcewen,
and Bruce A Edgar. Cytokine/jak/stat signaling mediates regeneration and homeostasis
in the drosophila midgut. *Cell*, 137(7) :1343–55, Jun 2009.
- [114] S L Jowett, C J Seal, M S Pearce, E Phillips, W Gregory, J R Barton, and M R Welfare.
Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis : a prospective cohort
study. *Gut*, 53(10) :1479–84, Oct 2004.
- [115] Anna Junell, Hanna Uvell, Leslie Pick, and Ylva Engström. Isolation of regulators of
drosophila immune defense genes by a double interaction screen in yeast. *Insect Biochem
Mol Biol*, 37(3) :202–12, Mar 2007.
- [116] Takashi Kaneko, William E Goldman, Peter Mellroth, Håkan Steiner, Koichi Fukase, Shoi-
chi Kusumoto, William Harley, Alvin Fox, Douglas Golenbock, and Neal Silverman. Mo-
nomic and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified lps stimulate the
drosophila imd pathway. *Immunity*, 20(5) :637–49, May 2004.
- [117] Takashi Kaneko, Tamaki Yano, Kamna Aggarwal, Jae-Hong Lim, Kazunori Ueda, Yoshi-
teru Oshima, Camilla Peach, Deniz Erturk-Hasdemir, William E Goldman, Byung-Ha Oh,
Shoichiro Kurata, and Neal Silverman. 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, Jul 2006.
- [118] Pankaj Kapahi, Brian M Zid, Tony Harper, Daniel Koslover, Viveca Sapin, and Seymour
Benzer. Regulation of lifespan in drosophila by modulation of genes in the tor signaling
pathway. *Curr Biol*, 14(10) :885–90, May 2004.
- [119] Jason Karpac, Andrew Younger, and Heinrich Jasper. Dynamic coordination of innate im-
mune signaling and insulin signaling regulates systemic responses to localized dna damage.
Developmental Cell, 20(6) :841–54, Jun 2011.

- [120] Arthur Kaser, Sebastian Zeissig, and Richard S Blumberg. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*, 28 :573–621, Jan 2010.
- [121] R S Khush and B Lemaitre. Genes that fight infection : what the drosophila genome says about animal immunity. *Trends Genet*, 16(10) :442–9, Oct 2000.
- [122] D A Kimbrell and B Beutler. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*, 2(4) :256–67, Apr 2001.
- [123] Christine Kocks, Ju Hyun Cho, Nadine Nehme, Johanna Ulvila, Alan M Pearson, Marie Meister, Charles Strom, Stephanie L Conto, Charles Hetru, Lynda M Stuart, Thilo Stehle, Jules A Hoffmann, Jean-Marc Reichhart, Dominique Ferrandon, Mika Rämetsä, and R Alan B Ezekowitz. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in drosophila. *Cell*, 123(2) :335–46, Oct 2005.
- [124] Shoichiro Kurata. Extracellular and intracellular pathogen recognition by drosophila pgrp-*le* and pgrp-*lc*. *International Immunology*, 22(3) :143–8, Mar 2010.
- [125] Shoichiro Kurata, Shigeru Ariki, and Shun ichiro Kawabata. Recognition of pathogens and activation of immune responses in drosophila and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology*, 211(4) :237–49, Jan 2006.
- [126] Eva Kurucz, Róbert Márkus, János Zsámboki, Katalin Folkl-Medzihradsky, Zsuzsanna Darula, Péter Vilmos, Andor Udvardy, Ildikó Krausz, Tamás Lukacsovich, Elisabeth Gateff, Carl-Johan Zettervall, Dan Hultmark, and István Andó. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with egf repeats in drosophila plasmatocytes. *Curr Biol*, 17(7) :649–54, Apr 2007.
- [127] M Lagueux, E Perrodou, E A Levashina, M Capovilla, and J A Hoffmann. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and jak gain-of-function mutants of drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(21) :11427–32, Oct 2000.
- [128] E S Lander, L M Linton, B Birren, C Nusbaum, M C Zody, J Baldwin, K Devon, K De-war, M Doyle, W FitzHugh, R Funke, D Gage, K Harris, A Heaford, J Howland, L Kann, J Lehoczyk, R LeVine, P McEwan, K McKernan, J Meldrim, J P Mesirov, C Miranda, W Morris, J Naylor, C Raymond, M Rosetti, R Santos, A Sheridan, C Sougnez, N Stange-Thomann, N Stojanovic, A Subramanian, D Wyman, J Rogers, J Sulston, R Ainscough, S Beck, D Bentley, J Burton, C Clee, N Carter, A Coulson, R Deadman, P Deloukas, A Dunham, I Dunham, R Durbin, L French, D Grafham, S Gregory, T Hubbard, S Humphray, A Hunt, M Jones, C Lloyd, A McMurray, L Matthews, S Mercer, S Milne, J C Mullikin, A Mungall, R Plumb, M Ross, R Shownkeen, S Sims, R H Waterston, R K Wilson, L W Hillier, J D McPherson, M A Marra, E R Mardis, L A Fulton, A T Chinwalla, K H Pepin, W R Gish, S L Chissoe, M C Wendl, K D Delehaunty, T L Miner, A Delehaunty, J B Kramer, L L Cook, R S Fulton, D L Johnson, P J Minx, S W Clifton, T Hawkins, E Branscomb, P Predki, P Richardson, S Wenning, T Slezak, N Doggett, J F Cheng, A Olsen, S Lucas, C Elkin, E Uberbacher, M Frazier, R A Gibbs, D M Muzny, S E Scherer, J B Bouck, E J Sodergren, K C Worley, C M Rives, J H Gorrell, M L Metzker, S L Naylor, R S Kucherlapati, D L Nelson, G M Weinstock, Y Sakaki, A Fujiyama, M Hattori, T Yada, A Toyoda, T Itoh, C Kawagoe, H Watanabe, Y Totoki, T Taylor, J Weissenbach, R Heilig, W Saurin, F Artiguenave, P Brottier, T Bruls, E Pelletier, C Robert, P Wincker, D R Smith, L Doucette-Stamm, M Rubenfield, K Weinstock, H M Lee, J Dubois, A Rosenthal, M Platzer, G Nyakatura, S Taudien, A Rump, H Yang, J Yu, J Wang, G Huang, J Gu, L Hood, L Rowen, A Madan, S Qin, R W Davis, N A Federspiel, A P Abola, M J Proctor, R M Myers, J Schmutz, M Dickson, J Grimwood, D R Cox, M V Olson, R Kaul, C Raymond, N Shimizu, K Kawasaki, S Minoshima, G A Evans, M Athanasiou, R Schultz, B A Roe, F Chen, H Pan, J Ramser, H Lehrach, R Reinhardt, W R McCombie, M de la Bastide, N Dedhia, H Blöcker, K Hornischer, G Nordsiek, R Agarwala, L Aravind, J A Bailey,

- A Bateman, S Batzoglou, E Birney, P Bork, D G Brown, C B Burge, L Cerutti, H C Chen, D Church, M Clamp, R R Copley, T Doerks, S R Eddy, E E Eichler, T S Furey, J Galagan, J G Gilbert, C Harmon, Y Hayashizaki, D Haussler, H Hermjakob, K Hokamp, W Jang, L S Johnson, T A Jones, S Kasif, A Kasprzyk, S Kennedy, W J Kent, P Kitts, E V Koonin, I Korf, D Kulp, D Lancet, T M Lowe, A McLysaght, T Mikkelsen, J V Moran, N Mulder, V J Pollara, C P Ponting, G Schuler, J Schultz, G Slater, A F Smit, E Stupka, J Szustakowski, D Thierry-Mieg, J Thierry-Mieg, L Wagner, J Wallis, R Wheeler, A Williams, Y I Wolf, K H Wolfe, S P Yang, R F Yeh, F Collins, M S Guyer, J Peterson, A Felsenfeld, K A Wetterstrand, A Patrinos, M J Morgan, P de Jong, J J Catanese, K Osoegawa, H Shizuya, S Choi, Y J Chen, J Szustakowski, and International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822) :860–921, Feb 2001.
- [129] R Lanot, D Zachary, F Holder, and M Meister. Postembryonic hematopoiesis in drosophila. *Dev Biol*, 230(2) :243–57, Feb 2001.
- [130] Sophie Layalle, Elise Coessens, Alain Ghysen, and Christine Dambly-Chaudière. Smooth, a hnarnp encoding gene, controls axonal navigation in drosophila. *Genes Cells*, 10(2) :119–25, Feb 2005.
- [131] Kyu-Sun Lee, Kwan-Hee You, Jong-Kil Choo, Yong-Mahn Han, and Kweon Yu. Drosophila short neuropeptide f regulates food intake and body size. *J Biol Chem*, 279(49) :50781–9, Dec 2004.
- [132] W J Lee, J D Lee, V V Kravchenko, R J Ulevitch, and P T Brey. Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, bombyx mori. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(15) :7888–93, Jul 1996.
- [133] M J Lehané. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 42 :525–50, Jan 1997.
- [134] B Lemaitre, E Nicolas, L Michaut, J M Reichhart, and J A Hoffmann. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell*, 86(6) :973–83, Sep 1996.
- [135] Bruno Lemaitre and Jules Hoffmann. The host defense of drosophila melanogaster. *Annu Rev Immunol*, 25 :697–743, Jan 2007.
- [136] François Leulier, Claudine Parquet, Sebastien Pili-Floury, Ji-Hwan Ryu, Martine Caroff, Won-Jae Lee, Dominique Mengin-Lecreulx, and Bruno Lemaitre. The drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol*, 4(5) :478–84, May 2003.
- [137] Ruth E Ley, Micah Hamady, Catherine Lozupone, Peter J Turnbaugh, Rob Roy Ramey, J Stephen Bircher, Michael L Schlegel, Tammy A Tucker, Mark D Schrenzel, Rob Knight, and Jeffrey I Gordon. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883) :1647–51, Jun 2008.
- [138] Ruth E Ley, Catherine A Lozupone, Micah Hamady, Rob Knight, and Jeffrey I Gordon. Worlds within worlds : evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 6(10) :776–88, Oct 2008.
- [139] Nouara Lhocine, Paulo S Ribeiro, Nicolas Buchon, Alexander Wepf, Rebecca Wilson, Tencho Tenev, Bruno Lemaitre, Matthias Gstaiger, Pascal Meier, and François Leulier. Pims modulates immune tolerance by negatively regulating drosophila innate immune signaling. *Cell Host Microbe*, 4(2) :147–58, Aug 2008.

- [140] D Li, C Scherfer, A M Korayem, Z Zhao, O Schmidt, and U Theopold. Insect hemolymph clotting : evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochem Mol Biol*, 32(8) :919–28, Aug 2002.
- [141] Petros Ligoxygakis, Nadège Pelte, Jules A Hoffmann, and Jean-Marc Reichhart. Activation of drosophila toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 297(5578) :114–6, Jul 2002.
- [142] Rachel Lyne, Richard Smith, Kim Rutherford, Matthew Wakeling, Andrew Varley, Francois Guillier, Hilde Janssens, Wenyan Ji, Peter McLaren, Philip North, Debashis Rana, Tom Riley, Julie Sullivan, Xavier Watkins, Mark Woodbridge, Kathryn Lilley, Steve Russell, Michael Ashburner, Kenji Mizuguchi, and Gos Micklem. Flymine : an integrated database for drosophila and anopheles genomics. *Genome Biol*, 8(7) :R129, Jan 2007.
- [143] Gang Ma, Douglas Hay, Dongmei Li, Sassan Asgari, and Otto Schmidt. Recognition and inactivation of lps by lipophorin particles. *Dev Comp Immunol*, 30(7) :619–26, Jan 2006.
- [144] Matthew R MacPherson, VALERIE P POLLOCK, LAURA KEAN, Tony D Southall, Maria E Giannakou, Kate E Broderick, Julian A T Dow, Roger C Hardie, and Shireen A Davies. Transient receptor potential-like channels are essential for calcium signaling and fluid transport in a drosophila epithelium. *Genetics*, 169(3) :1541–52, Mar 2005.
- [145] Frédéric Maillet, Vincent Bischoff, Cécile Vignal, Jules Hoffmann, and Julien Royet. The drosophila peptidoglycan recognition protein pgrp-lf blocks pgrp-lc and imd/jnk pathway activation. *Cell Host Microbe*, 3(5) :293–303, May 2008.
- [146] Junko Manaka, Takayuki Kuraishi, Akiko Shiratsuchi, Yuji Nakai, Haruhiro Higashida, Peter Henson, and Yoshinobu Nakanishi. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by drosophila hemocytes/macrophages. *J Biol Chem*, 279(46) :48466–76, Nov 2004.
- [147] Nathalie Martinek, Jaffer Shahab, Manuela Saathoff, and Maurice Ringuette. Haemocyte-derived sparc is required for collagen-iv-dependent stability of basal laminae in drosophila embryos. *J Cell Sci*, 121(Pt 10) :1671–80, May 2008.
- [148] Divya Mathur, Alyssa Bost, Ian Driver, and Benjamin Ohlstein. A transient niche regulates the specification of drosophila intestinal stem cells. *Science*, 327(5962) :210–3, Jan 2010.
- [149] M Meister, C Hetru, and J A Hoffmann. The antimicrobial host defense of drosophila. *Curr Top Microbiol Immunol*, 248 :17–36, Jan 2000.
- [150] Marie Meister and MARIE LAGUEUX. Drosophila blood cells. *Cell Microbiol*, 5(9) :573–80, Sep 2003.
- [151] Peter Mellroth, Jenny Karlsson, Janet Håkansson, Niklas Schultz, William E Goldman, and Håkan Steiner. Ligand-induced dimerization of drosophila peptidoglycan recognition proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(18) :6455–60, May 2005.
- [152] Peter Mellroth, Jenny Karlsson, and Hakan Steiner. A scavenger function for a drosophila peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem*, 278(9) :7059–64, Feb 2003.
- [153] Hans Merzendorfer and Lars Zimoch. Chitin metabolism in insects : structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol*, 206(Pt 24) :4393–412, Dec 2003.
- [154] Craig A Micchelli and Norbert Perrimon. Evidence that stem cells reside in the adult drosophila midgut epithelium. *Nature*, 439(7075) :475–9, Jan 2006.
- [155] Craig A Micchelli, Lisa Sudmeier, Norbert Perrimon, Shan Tang, and Ryan Beehler-Evans. Identification of adult midgut precursors in drosophila. *Gene Expr Patterns*, 11(1-2) :12–21, Jan 2011.

- [156] Tatiana Michel, Jean-Marc Reichhart, Jules A Hoffmann, and Julien Royet. Drosophila toll is activated by gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414 :756–759, Dec 2001.
- [157] Matthieu Million, Emmanouil Angelakis, Mical Paul, Fabrice Armougom, Leonard Leibovici, and Didier Raoult. Comparative meta-analysis of the effect of lactobacillus species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*, 53(2) :100–8, Aug 2012.
- [158] Christian Mitri, Laurent Soustelle, Bérénice Framery, Joël Bockaert, Marie-Laure Parmentier, and Yves Grau. Plant insecticide l-canavanine repels drosophila via the insect orphan gpcr dmX. *Plos Biol*, 7(6) :e1000147, Jun 2009.
- [159] Robin J Mockett and Rajindar S Sohal. Temperature-dependent trade-offs between longevity and fertility in the drosophila mutant, methuselah. *Exp Gerontol*, 41(6) :566–73, Jun 2006.
- [160] Luís F Moita, Rui Wang-Sattler, Kristin Michel, Timo Zimmermann, Stephanie Blandin, Elena A Levashina, and Fotis C Kafatos. In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in a. gambiae. *Immunity*, 23(1) :65–73, Jul 2005.
- [161] N S Morgan, D M Skovronsky, S Artavanis-Tsakonas, and M S Mooseker. The molecular cloning and characterization of drosophila melanogaster myosin-ia and myosin-ib. *J Mol Biol*, 239(3) :347–56, Jun 1994.
- [162] E. W Myers. A whole-genome assembly of drosophila. *Science*, 287(5461) :2196–2204, Mar 2000.
- [163] A J Nappi and B M Christensen. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions : applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 35(5) :443–59, May 2005.
- [164] A J Nappi and E Vass. Cytotoxic reactions associated with insect immunity. *Adv Exp Med Biol*, 484 :329–48, Jan 2001.
- [165] A J Nappi, E Vass, F Frey, and Y Carton. Superoxide anion generation in drosophila during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol*, 68(4) :450–6, Dec 1995.
- [166] A J Nappi, E Vass, F Frey, and Y Carton. Nitric oxide involvement in drosophila immunity. *Nitric Oxide*, 4(4) :423–30, Aug 2000.
- [167] Nadine T Nehme, Jessica Quintin, Ju Hyun Cho, Janice Lee, Marie-Céline Lafarge, Christine Kocks, and Dominique Ferrandon. Relative roles of the cellular and humoral responses in the drosophila host defense against three gram-positive bacterial infections. *PLoS ONE*, 6(3) :e14743, Jan 2011.
- [168] Claudine Neyen, Mickaël Poidevin, Alain Roussel, and Bruno Lemaitre. Tissue- and ligand-specific sensing of gram-negative infection in drosophila by pgrp-lc isoforms and pgrp-le. *J Immunol*, 189(4) :1886–97, Aug 2012.
- [169] Y Ogura, D K Bonen, N Inohara, D L Nicolae, F F Chen, R Ramos, H Britton, T Moran, R Karaliuskas, R H Duerr, J P Achkar, S R Brant, T M Bayless, B S Kirschner, S B Hannauer, G Nuñez, and J H Cho. A frameshift mutation in nod2 associated with susceptibility to crohn’s disease. *Nature*, 411(6837) :603–6, May 2001.
- [170] Benjamin Ohlstein and Allan Spradling. The adult drosophila posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*, 439(7075) :470–4, Jan 2006.
- [171] Benjamin Ohlstein and Allan Spradling. Multipotent drosophila intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science*, 315(5814) :988–92, Feb 2007.
- [172] Jari Oksanen, F Guillaume Blanchet, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Peter R Minchin, R B OHara, Gavin L Simpson, Peter Solymos, M Henry H Stevens, and Helene Wagner. vegan : Community ecology package. Jun 2012.

- [173] Takatomi Oku, Satoshi Iyama, Tsutomu Sato, Yasushi Sato, Maki Tanaka, Tamotsu Saggawa, Kageaki Kuribayashi, Tetsuya Sumiyosi, Kazuyuki Murase, Takuro Machida, Tetsuro Okamoto, Takuya Matsunaga, Tetsuji Takayama, Minoru Takahashi, Junji Kato, Hirofumi Hamada, and Yoshiro Niitsu. Amelioration of murine dextran sulfate sodium-induced colitis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Inflamm Bowel Dis*, 12(7) :630–40, Jul 2006.
- [174] Takashi Okumura, Akira Matsumoto, Teiichi Tanimura, and Ryutaro Murakami. An endoderm-specific gata factor gene, dgatae, is required for the terminal differentiation of the drosophila endoderm. *Dev Biol*, 278(2) :576–86, Feb 2005.
- [175] Takashi Okumura, Reiko Tajiri, Tetsuya Kojima, Kaoru Saigo, and Ryutaro Murakami. Gatae-dependent and -independent expressions of genes in the differentiated endodermal midgut of drosophila. *Gene Expr Patterns*, 7(1-2) :178–86, Jan 2007.
- [176] Birgitta Olofsson and Damon T Page. Condensation of the central nervous system in embryonic drosophila is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol*, 279(1) :233–43, Mar 2005.
- [177] Juan C Paredes, David P Welchman, Mickaël Poidevin, and Bruno Lemaitre. Negative regulation by amidase pgrps shapes the drosophila antibacterial response and protects the fly from innocuous infection. *Immunity*, 35(5) :770–9, Nov 2011.
- [178] Ji-Won Park, Chan-Hee Kim, Jung-Hyun Kim, Byung-Rok Je, Kyung-Baeg Roh, Su-Jin Kim, Hyeon-Hwa Lee, Ji-Hwan Ryu, Jae-Hong Lim, Byung-Ha Oh, Won-Jae Lee, Nam-Chul Ha, and Bok-Luel Lee. Clustering of peptidoglycan recognition protein-sa is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(16) :6602–7, Apr 2007.
- [179] José Carlos Pastor-Pareja, Ming Wu, and Tian Xu. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in drosophila. *Dis Model Mech*, 1(2-3) :144–54 ; discussion 153, Jan 2008.
- [180] Alan M Pearson, Katalin Baksa, Mika Rämetsä, Meredith Protas, Mary McKee, Dennis Brown, and R Alan B Ezekowitz. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in drosophila. *Microbes and Infection*, pages 1–10, Aug 2003.
- [181] Jennifer A Philips, Eric J Rubin, and Norbert Perrimon. Drosophila rnai screen reveals cd36 family member required for mycobacterial infection. *Science*, 309(5738) :1251–3, Aug 2005.
- [182] Jennifer A Philips, Eric J Rubin, and Norbert Perrimon. Drosophila rnai screen reveals cd36 family member required for mycobacterial infection som. *Science*, pages 1–18, Jul 2005.
- [183] Sebastien Pili-Floury, François Leulier, Kuniaki Takahashi, Kaoru Saigo, Emmanuel Sainmain, Ryu Ueda, and Bruno Lemaitre. In vivo rna interference analysis reveals an unexpected role for gnbp1 in the defense against gram-positive bacterial infection in drosophila adults. *J Biol Chem*, 279(13) :12848–53, Mar 2004.
- [184] A Poltorak, Xiaolong He, Irina Smirnova, Mu-Ya Liu, Christophe Van Huffell, Xin Du, Dale Birdwell, Erica Alejos, Maria Silva, Chris Galanos, Marina Freudenberg, Paola Ricciardi-Castagnoli, Betsy Layton, and Bruce Beutler. Defective lps signaling in c3h/hej and c57bl/10scrc mice : Mutations in tlr4 gene. *Science*, 282(5396) :2085–2088, Dec 1998.
- [185] Laurel A Raftery, Vernon Twombly, Kristi Wharton, and William M Gelbar. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in drosophila. *Genetics*, 139 :241–254, Feb 1995.

- [186] M Rämets, A Pearson, P Manfrulli, X Li, H Koziel, V Göbel, E Chung, M Krieger, and R A Ezekowitz. Drosophila scavenger receptor ci is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity*, 15(6) :1027–38, Dec 2001.
- [187] Mika Rämets, Pascal Manfrulli, Alan Pearson, Bernard Mathey-Prevot, and R Alan B Ezekowitz. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a drosophila receptor for e. coli. *Nature*, 416(6881) :644–8, Apr 2002.
- [188] Jean Marc Reichhart, David Gubb, and Vincent Leclerc. The drosophila serpins : multiple functions in immunity and morphogenesis. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 499 :205–25, Jan 2011.
- [189] Chunli Ren, Paul Webster, Steven E Finkel, and John Tower. Increased internal and external bacterial load during drosophila aging without life-span trade-off. *Cell Metab*, 6(2) :144–52, Aug 2007.
- [190] Emma V Ridley, Adam C-N Wong, Stephanie Westmiller, and Angela E Douglas. Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of drosophila melanogaster. *PLoS ONE*, 7(5) :e36765, Jan 2012.
- [191] T M Rizki and R M Rizki. Lamellocyte differentiation in drosophila larvae parasitized by leptonilina. *Dev Comp Immunol*, 16(2-3) :103–10, Jan 1992.
- [192] T M Rizki, R M Rizki, and Y Carton. Leptonilina heterotoma and l. bouardi : strategies to avoid cellular defense responses of drosophila melanogaster. *Exp Parasitol*, 70(4) :466–75, May 1990.
- [193] Sophie Rutschmann, Alain C Jung, Charles Hetru, Jean-Marc Reichhart, Jules A Hoffmann, and Dominique Ferrandon. The rel protein dif mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in drosophila. *Immunity*, 12 :569–580, May 2000.
- [194] Ji-Hwan Ryu, Sung-Hee Kim, Hyo-Young Lee, Jin Young Bai, Young-Do Nam, Jin-Woo Bae, Dong Gun Lee, Seung Chul Shin, Eun-Mi Ha, and Won-Jae Lee. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in drosophila. *Science*, 319(5864) :777–82, Feb 2008.
- [195] Ji-Hwan Ryu, Ki-Bum Nam, Chun-Taek Oh, Hyuck-Jin Nam, Sung-Hee Kim, Joo-Heon Yoon, Je-Kyeong Seong, Mi-Ae Yoo, In-Hwan Jang, Paul T Brey, and Won-Jae Lee. The homeobox gene caudal regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in drosophila epithelia. *Mol Cell Biol*, 24(1) :172–85, Jan 2004.
- [196] N Saitou and M Nei. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4) :406–25, Jul 1987.
- [197] Christopher J Sampson, Susanna Valanne, Marie-Odile Fauvarque, Dan Hultmark, Mika Rämets, and Michael J Williams. The rhogef zizimin-related acts in the drosophila cellular immune response via the rho gtpases rac2 and cdc42. *Dev Comp Immunol*, 38(1) :160–8, Sep 2012.
- [198] Diego Sanchez, Begoña López-Arias, Laura Torroja, Inmaculada Canal, Xiaohui Wang, Michael J Bastiani, and Maria D Ganfornina. Loss of glial lazaro, a homolog of apolipoprotein d, reduces lifespan and stress resistance in drosophila. *Curr Biol*, 16(7) :680–6, Apr 2006.
- [199] Christoph Scherfer, Mousumi R Qazi, Kuniaki Takahashi, Ryu Ueda, Mitchell S Dushay, Ulrich Theopold, and Bruno Lemaitre. The toll immune-regulated drosophila protein fondu is involved in hemolymph clotting and puparium formation. *Dev Biol*, 295(1) :156–63, Jul 2006.

- [200] Holger Schwender. siggenes : Multiple testing using sam and efron’s empirical bayes approaches. 2012.
- [201] Heather C Sears, Caleb J Kennedy, and Paul A Garrity. Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal drosophila cns morphogenesis. *Development*, 130(15) :3557–65, Aug 2003.
- [202] Kate Senger, Kristina Harris, and Mike Levine. Gata factors participate in tissue-specific immune responses in drosophila larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(43) :15957–62, Oct 2006.
- [203] Shubha Shanbhag and Subrata Tripathi. Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the drosophila midgut. *J Exp Biol*, 212(Pt 11) :1731–44, Jun 2009.
- [204] Gil Sharon, Daniel Segal, John M Ringo, Abraham Hefetz, Ilana Zilber-Rosenberg, and Eugene Rosenberg. Commensal bacteria play a role in mating preference of drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(46) :20051–6, Nov 2010.
- [205] Gil Sharon, Daniel Segal, Ilana Zilber-Rosenberg, and Eugene Rosenberg. Symbiotic bacteria are responsible for diet-induced mating preference in drosophila melanogaster, providing support for the hologenome concept of evolution. *Gut Microbes*, 2(3) :190–2, Jan 2011.
- [206] Rachael L Shaw, Alexander Kohlmaier, Cédric Polesello, Cornelia Veelken, Bruce A Edgar, and Nicolas Tapon. The hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during drosophila adult midgut regeneration. *Development*, 137(24) :4147–58, Dec 2010.
- [207] A. K. H Shia, M Glittenberg, G Thompson, A. N Weber, J.-M Reichhart, and P Ligoxygakis. Toll-dependent antimicrobial responses in drosophila larval fat body require spatzle secreted by haemocytes. *J Cell Sci*, 122(24) :4505–4515, Dec 2009.
- [208] Roland J Siezen and Johan E T van Hylckama Vlieg. Genomic diversity and versatility of lactobacillus plantarum, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10 Suppl 1 :S3, Aug 2011.
- [209] Anne F Simon, Cindy Shih, Antha Mack, and Seymour Benzer. Steroid control of longevity in drosophila melanogaster. *Science*, 299(5611) :1407–10, Feb 2003.
- [210] Gavin L Simpson. permute : Functions for generating restricted permutations of data. Apr 2012.
- [211] Danielle A Skorupa, Azra Dervisevendic, Jessica Zwiener, and Scott D Pletcher. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in drosophila melanogaster. *Aging Cell*, 7(4) :478–90, Aug 2008.
- [212] K Söderhäll and L Cerenius. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*, 10(1) :23–8, Feb 1998.
- [213] Richard Paul Sorrentino, Yves Carton, and Shubha Govind. Cellular immune response to parasite infection in the drosophila lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol*, 243(1) :65–80, Mar 2002.
- [214] Carolyn R Stenbak, Ji-Hwan Ryu, François Leulier, Lemaitre, Dominique Mengin-Lecreulx, Catherine Chaput, Ivo G Boneca, Won-Jae Lee, Bruno Sebastien Pili-Floury, Claudine Parquet, and Mireille Hervé. Immune deficiency pathway drosophila allowing detection by the peptidoglycan molecular requirements. *Journal of Immunology*, pages 1–11, Nov 2004.
- [215] Martin Stofanko, So Yeon Kwon, and Paul Badenhorst. Lineage tracing of lamellocytes demonstrates drosophila macrophage plasticity. *PLoS ONE*, 5(11) :e14051, Jan 2010.

- [216] Gilles Storelli, Arnaud Defaye, Berra Erkosar, Pascal Hols, Julien Royet, and François Leulier. Lactobacillus plantarum promotes drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through tor-dependent nutrient sensing. *Cell Metab*, 14(3) :403–14, Sep 2011.
- [217] Marie Strand and Craig A Micchelli. Quiescent gastric stem cells maintain the adult drosophila stomach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(43) :17696–701, Oct 2011.
- [218] Shannon L Stroschein-Stevenson, Edan Foley, Patrick H O’Farrell, and Alexander D Johnson. Identification of drosophila gene products required for phagocytosis of candida albicans. *Plos Biol*, 4(1) :e4, Jan 2006.
- [219] Lynda M Stuart and R Alan Ezekowitz. Phagocytosis and comparative innate immunity : learning on the fly. *Nat Rev Immunol*, 8(2) :131–41, Feb 2008.
- [220] Aya Takehana, Tomonori Katsuyama, Tamaki Yano, Yoshiteru Oshima, Haruhiko Takada, Toshiro Aigaki, and Shoichiro Kurata. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-le, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in drosophila larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(21) :13705–10, Oct 2002.
- [221] Aya Takehana, Tamaki Yano, Shizuka Mita, Atsushi Kotani, Yoshiteru Oshima, and Shoichiro Kurata. Peptidoglycan recognition protein (pgrp)-le and pgrp-lc act synergistically in drosophila immunity. *EMBO J*, 23(23) :4690–700, Nov 2004.
- [222] Huaping Tang, Zakaria Kambris, Bruno Lemaitre, and Carl Hashimoto. A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of drosophila. *Developmental Cell*, 15(4) :617–26, Oct 2008.
- [223] M Tatar, A Kopelman, D Epstein, M P Tu, C M Yin, and R S Garofalo. A mutant drosophila insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514) :107–10, Apr 2001.
- [224] R Core Team. R : A language and environment for statistical computing. *ISBN 3-900051-07-0*, 2012.
- [225] Luís Teixeira, Alvaro Ferreira, and Michael Ashburner. The bacterial symbiont wolbachia induces resistance to rna viral infections in drosophila melanogaster. *Plos Biol*, 6(12) :e2, Dec 2008.
- [226] Aurelio A Teleman. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in drosophila. *Biochem. J.*, 425(1) :13–26, Jan 2010.
- [227] Selim Terhzaz, F CLAIRE OCONNELL, VALERIE P POLLOCK, LAURA KEAN, Shireen A Davies, Jan A Veenstra, and Julian A T Dow. Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of drosophila melanogaster. *Journal of Experimental Biology*, pages 1–10, Nov 1999.
- [228] Ulrich Theopold, Otto Schmidt, Kenneth Söderhäll, and Mitchell S Dushay. Coagulation in arthropods : defence, wound closure and healing. *Trends Immunol*, 25(6) :289–94, Jun 2004.
- [229] Peter J Turnbaugh, Ruth E Ley, Micah Hamady, Claire M Fraser-Liggett, Rob Knight, and Jeffrey I Gordon. The human microbiome project. *Nature*, 449(7164) :804–10, Oct 2007.
- [230] Peter J Turnbaugh, Ruth E Ley, Michael A Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R Mardis, and Jeffrey I Gordon. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122) :1027–31, Dec 2006.

- [231] P Tzou, S Ohresser, D Ferrandon, M Capovilla, J M Reichhart, B Lemaitre, J A Hoffmann, and J L Imler. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in drosophila surface epithelia. *Immunity*, 13(5) :737–48, Nov 2000.
- [232] Phoebe Tzou, Ennio De Gregorio, and Bruno Lemaitre. How drosophila combats microbial infection : a model to study innate immunity and host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, pages 1–9, Jan 2002.
- [233] Hanna Uvell and Ylva Engström. A multilayered defense against infection : combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet*, 23(7) :342–9, Jul 2007.
- [234] E Vass and A J Nappi. The effects of dietary yeast on the cellular immune response of drosophila melanogaster against the larval parasitoid, leptopilina boulandi. *J Parasitol*, 84(4) :870–2, Aug 1998.
- [235] Jan A Veenstra, Hans-Jürgen Agricola, and Azza Sellami. Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell Tissue Res*, 334(3) :499–516, Dec 2008.
- [236] Stefanie N Vogel. How discovery of toll-mediated innate immunity in drosophila impacted our understanding of tlr signaling (and vice versa). *J Immunol*, 188(11) :5207–9, Jun 2012.
- [237] John Vu and John Carvalho. Enterococcus : review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front. Biol.*, 6(5) :357–366, Oct 2011.
- [238] Christina Wagner, Kerstin Isermann, Heinz Fehrenbach, and Thomas Roeder. Molecular architecture of the fruit fly’s airway epithelial immune system. *BMC Genomics*, 9 :446, Jan 2008.
- [239] David W Walker, Julien Muffat, Colin Rundel, and Seymour Benzer. Overexpression of a drosophila homolog of apolipoprotein d leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol*, 16(7) :674–9, Apr 2006.
- [240] Lihui Wang, Alexander N R Weber, Magda L Atilano, Sergio R Filipe, Nicholas J Gay, and Petros Ligoxygakis. Sensing of gram-positive bacteria in drosophila : Gnbp1 is needed to process and present peptidoglycan to pgrp-sa. *EMBO J*, 25(20) :5005–14, Oct 2006.
- [241] Fiona L Watson, Roland Püttmann-Holgado, Franziska Thomas, David L Lamar, Michael Hughes, Masahiro Kondo, Vivienne I Rebel, and Dietmar Schmucker. Extensive diversity of ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309(5742) :1874–8, Sep 2005.
- [242] W G Weisburg, S M Barns, D A Pelletier, and D J Lane. 16s ribosomal dna amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173(2) :697–703, 1991.
- [243] Thomas Werner, Karin Borge-Renberg, Peter Mellroth, Hakan Steiner, and Dan Hultmark. Functional diversity of the drosophila pgrp-lc gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem*, 278(29) :26319–22, Jul 2003.
- [244] Chun Nin Adam Wong, Patrick Ng, and Angela E Douglas. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly drosophila melanogaster. *Environ Microbiol*, 13(7) :1889–900, Jul 2011.
- [245] Richard Wong, Matthew D W Piper, Bregje Wertheim, and Linda Partridge. Quantification of food intake in drosophila. *PLoS ONE*, 4(6) :e6063, Jan 2009.
- [246] Will Wood and Antonio Jacinto. Drosophila melanogaster embryonic haemocytes : masters of multitasking. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7) :542–51, Jul 2007.
- [247] Qi Wu, Tieqiao Wen, Gyunghee Lee, Jae H Park, Haini N Cai, and Ping Shen. Developmental control of foraging and social behavior by the drosophila neuropeptide y-like system. *Neuron*, 39(1) :147–61, Jul 2003.

- [248] Shih-Cheng Wu, Chih-Wei Liao, Rong-Long Pan, and Jyh-Lyh Juang. Infection-induced intestinal oxidative stress triggers organ-to-organ immunological communication in drosophila. *Cell Host Microbe*, 11(4) :410–7, Apr 2012.
- [249] Jian Xu, Magnus K Bjursell, Jason Himrod, Su Deng, Lynn K Carmichael, Herbert C Chiang, Lora V Hooper, and Jeffrey I Gordon. A genomic view of the human-bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*, 299(5615) :2074–6, Mar 2003.
- [250] Anna Zaidman-Rémy, Mireille Hervé, Mickael Poidevin, Sébastien Pili-Floury, Min-Sung Kim, Didier Blanot, Byung-Ha Oh, Ryu Ueda, Dominique Mengin-Lecreulx, and Bruno Lemaitre. The drosophila amidase pgrp-lb modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24(4) :463–73, Apr 2006.
- [251] Anna Zaidman-Rémy, Mickael Poidevin, Mireille Hervé, David P Welchman, Juan C Paredes, Carina Fahlander, Hakan Steiner, Dominique Mengin-Lecreulx, and Bruno Lemaitre. Drosophila immunity : analysis of pgrp-sb1 expression, enzymatic activity and function. *PLoS ONE*, 6(2) :e17231, Jan 2011.
- [252] Rong Zhang, Hae Yun Cho, Hyun Sic Kim, Young Gerl Ma, Tsukasa Osaki, Shun ichiro Kawabata, Kenneth Söderhäll, and Bok Luel Lee. Characterization and properties of a 1,3-beta-d-glucan pattern recognition protein of tenebrio molitor larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation. *J Biol Chem*, 278(43) :42072–9, Oct 2003.
- [253] Huiwen W Zhao, Dan Zhou, and Gabriel G Haddad. Antimicrobial peptides increase tolerance to oxidant stress in drosophila melanogaster. *J Biol Chem*, 286(8) :6211–8, Feb 2011.
- [254] Huiwen W Zhao, Dan Zhou, Victor Nizet, and Gabriel G Haddad. Experimental selection for drosophila survival in extremely high o2 environments. *PLoS ONE*, 5(7) :e11701, Jan 2010.
- [255] Ingo Zinke, Christina S Schütz, Jörg D Katzenberger, Matthias Bauer, and Michael J Pankrat. Nutrient control of gene expression in drosophila : microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J*, 21(22) :6162–73, Nov 2002.